

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|   |   |   |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference<br>59190-881  | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |   |
| International application No.<br>PCT/FR98/02244   | International filing date ( <i>day/month/year</i> )<br>20 October 1998 (20.10.98)   | Priority date ( <i>day/month/year</i> )<br>20 October 1997 (20.10.97) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>C12Q 1/68 |   |   |
| Applicant<br>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)           |   |   |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

|  |   |
|--|---|
| Date of submission of the demand<br>30 April 1999 (30.04.99) | Date of completion of this report<br>12 January 2000 (12.01.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP                      | Authorized officer  |
| Facsimile No.  | Telephone No.   |

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/02244

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-35, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-23, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/2-2/2, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

|                               |        |      |     |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-23 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-23 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-23 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |

**2. Citations and explanations****1). Preamble**

In view of the description, "a repertoire" comprises a **panel** of immunoreceptors; cf. pages 4 and 5. It would therefore appear that a "repertoire" according to the present documentation method\* can be considered to be a coherent whole forming a unit in relation to a type of activity. The term "repertoire" (cf. Claim 1) therefore appears to refer to the array of NKR immunoreceptors and/or NKR counterparts expressed in a given individual at a given moment.

\*) this appears to be the first description of such a documentation method, cf.V.2 below.

**2). Novelty**

Nothing in D1: Mingari et al., D3: Adamkiewicz et al. and D4: Yabe et al. would appear to suggest that consideration of all the NKRs and their counterparts as a repertoire allows good evaluation of the state of immunity activation. The teaching of the three documents cited above does not appear to give access to primers according to the present Claim 1(i). None of the cited documents appears to disclose products

corresponding to the particular examples of pairs of oligonucleotides cited as an illustration of the implementation of the method according to the invention.

#### Inventive step

The present invention would appear to enable GVL therapies not mastered thus far to be implemented, c.f. page 4.

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS



## PCT

REC'D 18 JAN 2000

WIPO PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

|  |   |  |
|--|---|--|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br>CP/FP/VB 59190  | <b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)                          |  |
| Demande internationale n°<br>PCT/FR98/02244  | Date du dépôt international (jour/mois/année)<br>20/10/1998   | Date de priorité (jour/mois/année)<br>20/10/1997 |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB<br>C12Q1/68   |   |  |
| Déposant<br>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA R. .. et al   |   |  |
| <p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>  |   |  |
| <p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul> |   |  |
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale<br>30/04/1999  | Date d'achèvement du présent rapport<br>12.01.00  |  |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:<br> Office européen des brevets<br>D-80298 Munich<br>Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465   | Fonctionnaire autorisé<br>Cuendet, P<br>N° de téléphone +49 89 2399 8690<br> |  |

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02244

**1. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-35                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-23                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/2-2/2                      version initiale

**2. Les modifications ont entraîné l'annulation :**

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,              feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

**4. Observations complémentaires, le cas échéant :**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02244

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Nouveauté                              | Oui : Revendications 1-23 |
|  | Non : Revendications      |
| Activité inventive                     | Oui : Revendications 1-23 |
|  | Non : Revendications      |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : Revendications 1-23 |
|  | Non : Revendications      |

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

1). **Préambule**

Au vu de la description "un répertoire" comprend un **panel** d'immunorécepteurs; cf. p.4 et p.5. Il semblerait donc qu' un "répertoire" selon la présente méthode de documentation\* puisse être considéré comme un ensemble cohérent formant une unité par rapport à un type d'activité. Le terme "répertoire" (cf. revendication 1) semble faire ainsi référence au panel d'immunorécepteurs NKR et/ou contreparties de NKR exprimé chez un individu donné à un instant donné.

---

\*)il s'agirait de la première description d'une telle méthode de documentation, cf. au point V.2 ci-dessous

2). **Point V.2.****Nouveauté**

Rien dans D1: Mingari et al. D3: Adamkiewicz et al. et D4: Yabe et al. ne semblerait suggérer que considérer l'ensemble des NKR et de leurs contreparties comme un répertoire, permette une bonne évaluation de l'état d'activation immunitaire. L'enseignement des 3 documents précités ne semble pas donner accès à des amorces selon la présente revendication 1, point i. Apparemment, aucun des documents cités ne divulgue de produits correspondant aux exemples particuliers de paires d'oligonucléotides citées en illustration de la mise en oeuvre de la méthode selon l'invention.

**Activité inventive**

Il semblerait que la présente invention permette la mise en oeuvre de thérapies GVL jusqu'alors non maîtrisées, cf. p.4.



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

|  |   |
|--|---|
| <b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année)<br>10 juillet 1999 (10.07.99)           |   |
| <b>Demande internationale no</b><br>PCT/FR98/02244                                 | <b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b><br>59190-881   |
| <b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année)<br>20 octobre 1998 (20.10.98) | <b>Date de priorité</b> (jour/mois/année)<br>20 octobre 1997 (20.10.97) |
| <b>Déposant</b><br>VIVIER, Eric etc  |   |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

30 avril 1999 (30.04.99)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

D. Barmes

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

PEAUCELLE, Chantal  
Cabinet Armengaud Ainé  
3, avenue Bugeaud  
F-75116 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

27 septembre 1999 (27.09.99)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

59190-881

Demande internationale no

PCT/FR98/02244

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Date du dépôt international (jour/mois/année)

20 octobre 1998 (20.10.98)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:



le déposant



l'inventeur



le mandataire



le représentant commun

Nom et adresse

VIVIER, Eric  
23, boulevard Jean Jaurès  
F-13260 Cassis  
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:



la personne



le nom



l'adresse



la nationalité



le domicile

Nom et adresse

VIVIER, Eric  
20bis, chemin du Boudard  
F-13260 Cassis  
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:



à l'office récepteur



aux offices désignés concernés



à l'administration chargée de la recherche internationale



aux offices élus concernés



à l'administration chargée de l'examen préliminaire international



autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

S. Cruz

no de téléphone (41-22) 338.83.38

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 98/02244

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie ° | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| X           | <p>MINGARI M. C. ET AL.,:</p> <p>"Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-a as the only HLA class I-specific inhibitory receptor"</p> <p>EUR. J. IMMUNOLOGY,</p> <p>vol. 27, - juin 1997 pages 1374-1380,</p> <p>XP002072518</p> <p>le doc.en entier, et p.1375, 2.6;</p> <p>discussion</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | <p>1,2,17,</p> <p>23</p>      |



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 janvier 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Müller, F

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

|   |   |   |
|---|---|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br><b>59190-881</b>     | <b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après<br><b>A DONNER</b> |   |
| Demande internationale n°<br><b>PCT/FR 98/ 02244</b>                      | Date du dépôt international (jour/mois/année)<br><b>20/10/1998</b>  | (Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année)<br><b>20/10/1997</b> |
| Déposant<br><br><b>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA R. ..et al.</b> |   |   |

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

3. ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence

☒ déposé avec la demande internationale

☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale

☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.

☐ transcrit par l'administration

4. En ce qui concerne le titre, ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:

Figure n°                      ☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X         | <p>HIBY S.E. ET AL.,: "Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing"</p> <p>MOL. IMMUNOLOGY,<br/>vol. 34, no. 5, - avril 1997 pages 419-430, XP002090558<br/>see whole doc, esp. abstract and table 1 and 3</p> <p>---</p>                  | 1-4, 23                       |
| X         | <p>ADAMKIEWICZ T. V. ET AL.,: "Natural killer lectin-like receptors have divergent carboxy-termini, distinct from C-type lectins"</p> <p>IMMUNOGENETICS,<br/>vol. 39, - 1994 page 218 XP002072519<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p>   | 1, 23                         |
| X         | <p>YABE T. ET AL.,: "A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins"</p> <p>IMMUNOGENETICS,<br/>vol. 37, no. 6, - 1993 pages 455-460, XP002072520<br/>see esp. M&amp;M, discussion</p> <p>---</p>  | 1, 23                         |
| A         | <p>BOTTINO C. ET AL.,: "A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation"</p> <p>EUR. J. IMMUNOL.,<br/>vol. 26, - août 1996 pages 1816-1824, XP002072521<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p> |                               |
| A         | <p>CAMBIAGGI A. ET AL.,: "Natural killer cell acceptance of H-2 mismatch bone marrow grafts in transgenic mice expressing HLA-Cw3 specific killer cell inhibitory receptor (CD158b)"</p> <p>PROC. ACAD. SCI. USA,<br/>vol. 94, - juillet 1997 pages 8088-8092, XP002072522<br/>voir le document en entier</p> <p>-----</p>                                      |                               |

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|  |    |   |
|--|----|---|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :<br>C12Q 1/68 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 99/20794<br>(43) Date de publication internationale: 29 avril 1999 (29.04.99) |
|--|----|---|

|   |  |
|---|--|
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02244<br>(22) Date de dépôt international: 20 octobre 1998 (20.10.98)<br>(30) Données relatives à la priorité:<br>97/13115 20 octobre 1997 (20.10.97) FR<br>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).<br>(72) Inventeurs; et<br>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): VIVIER, Eric [FR/FR]; 23, boulevard Jean Jaurès, F-13260 Cassis (FR). VELY, Frédéric [FR/FR]; Résidence du Vallat, La Farendole, F-13260 Cassis (FR).<br>(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aîné, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR). | (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br>Publiée<br>Avec rapport de recherche internationale. |
|---|--|

(54) Title: DOCUMENTATION MEANS FOR REPERTOIRES OF NKR IMMUNORECEPTORS AND/OR ACTIVATORY OR NON-INHIBITORY IMMUNORECEPTOR COUNTERPARTS OF NKR IMMUNORECEPTORS

(54) Titre: MOYENS DE DOCUMENTATION DE REPERTOIRES EN IMMUNORECEPTEURS NKR ET/OU EN IMMUNORECEPTEURS CONTREPARTIES ACTIVATRICES OU NON INHIBITRICES D'IMMUNORECEPTEURS NKR

(57) Abstract

The invention concerns an *in vitro* method for documenting a repertoire in NKR immunoreceptors and/or NKR counterparts, consisting in (i) using at least a pair of oligonucleotides 3' and 5' capable of being hybridised with a target NKR receptor, or NKR counterpart, and not capable of being hybridised with a functional counterpart of said target receptor; (ii) contacting said pair of oligonucleotides 3' and 5' with the DNA or DNAC of a sample under study; and (iii) detecting the ultimately formed hybrids. The invention also concerns the biological applications of said method, in particular for screening banks of organs, tissues and cells for transplant, and kits for its implementation.

(57) Abrégé

L'invention concerne une méthode *in vitro* de documentation d'un répertoire en immunorécepteur(s) NKR et/ou contreparties de NKR, comprenant (i) l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' capable de s'hybrider à un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, et de ne pas s'hybrider à un récepteur contrepartie fonctionnelle de ce récepteur cible; (ii) la mise en contact de cette paire d'oligonucléotides 3' et 5' avec l'ADN ou ADNc d'un échantillon à étudier; et (iii) la détection des hybrides éventuellement formés. L'invention vise également les applications biologiques de cette méthode, notamment criblage de banque d'organes, tissus, cellules en vue de greffes, et à des kits pour sa mise en oeuvre.

PCT

ORC

ATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLE  
Bureau international

LE



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b><br><b>C12Q 1/68</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/20794</b><br><b>(43) Date de publication internationale: 29 avril 1999 (29.04.99)</b>   |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/02244<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 20 octobre 1998 (20.10.98)<br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/13115 20 octobre 1997 (20.10.97) FR<br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).<br><b>(72) Inventeurs; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> VIVIER, Eric [FR/FR]; 23, boulevard Jean Jaurès, F-13260 Cassis (FR). YELY, Frédéric [FR/FR]; Résidence du Vallat, La Farendole, F-13260 Cassis (FR).<br><b>(74) Mandataires:</b> PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).   |           | <b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i> |
| <b>(54) Title:</b> DOCUMENTATION MEANS FOR REPERTOIRES OF NKR IMMUNORECEPTORS AND/OR ACTIVATORY OR NON-INHIBITORY IMMUNORECEPTOR COUNTERPARTS OF NKR IMMUNORECEPTORS<br><b>(54) Titre:</b> MOYENS DE DOCUMENTATION DE REPERTOIRES EN IMMUNORECEPTEURS NKR ET/OU EN IMMUNORECEPTEURS CONTREPARTIES ACTIVATRICES OU NON INHIBITRICES D'IMMUNORECEPTEURS NKR<br><b>(57) Abstract</b><br><p>The invention concerns an <i>in vitro</i> method for documenting a repertoire in NKR immunoreceptors and/or NKR counterparts, consisting in (i) using at least a pair of oligonucleotides 3' and 5' capable of being hybridised with a target NKR receptor, or NKR counterpart, and not capable of being hybridised with a functional counterpart of said target receptor; (ii) contacting said pair of oligonucleotides 3' and 5' with the DNA or DNAC of a sample under study; and (iii) detecting the ultimately formed hybrids. The invention also concerns the biological applications of said method, in particular for screening banks of organs, tissues and cells for transplant, and kits for its implementation.</p> <b>(57) Abrégé</b><br><p>L'invention concerne une méthode <i>in vitro</i> de documentation d'un répertoire en immunorécepteur(s) NKR et/ou contreparties de NKR, comprenant (i) l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' capable de s'hybrider à un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, et de ne pas s'hybrider à un récepteur contrepartie fonctionnelle de ce récepteur cible; (ii) la mise en contact de cette paire d'oligonucléotides 3' et 5' avec l'ADN ou ADNc d'un échantillon à étudier; et (iii) la détection des hybrides éventuellement formés. L'invention vise également les applications biologiques de cette méthode, notamment criblage de banque d'organes, tissus, cellules en vue de greffes, et à des kits pour sa mise en oeuvre.</p> |           |   |

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Brésil                    | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakstan                                     | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |



**Moyens de documentation de répertoires  
en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties  
activatrices ou non inhibitrices d'immunorécepteurs NKR**

La présente invention concerne des moyens permettant de documenter les répertoires d'un individu humain ou animal en immunorécepteurs NKR (*Natural Killer Receptor*) du type des immunoglobulines ou du type des lectines, et en immunorécepteurs contreparties activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices, d'immunorécepteurs NKR. Elle vise également leurs applications biologiques.

Les fonctions immunitaires d'un homme ou d'un animal sont définies par plusieurs catégories de molécules hautement diversifiées, telles que notamment le système des groupes sanguins ABO, la famille des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, appelé chez l'homme, système HLA – *Human Leukocyte Antigen*-), la famille des récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR). L'ensemble des molécules qu'un individu adulte exprime, ou est capable d'exprimer, pour chacune de ces différentes familles constitue, exception faite des vrais jumeaux, un répertoire évolutif qui lui est propre et qui intervient dans la reconnaissance du soi ou du non-soi.

D'autres grands répertoires ont été plus récemment identifiés. Il s'agit du répertoire en récepteurs NKR de type immunoglobuline et du répertoire en récepteurs NKR de type lectine. Les récepteurs NKR de type immunoglobuline comprennent les récepteurs KIR (*Killer cell Inhibitory Receptor*) tels que notamment les récepteurs p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH. Les récepteurs NKR de type lectine comprennent les récepteurs inhibiteurs NKG2 tels que notamment les récepteurs NKG2A et NKG2B. L'ensemble de ces récepteurs

NKR sont à fonction inhibitrice. Des récepteurs qui leur sont hautement homologues, en particulier au niveau extracytoplasmique, assurent toutefois des fonctions activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices : il s'agit des récepteurs KAR (*Killer cell Activatory Receptor*) homologues aux récepteurs KIR, et des récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E et NKG2F homologues aux récepteurs NKG2A et NKG2B. Les récepteurs contreparties activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices, de récepteurs inhibiteurs NKR sont ci-après désignés, par souci de fluidité, contreparties de NKR.

Les récepteurs NKR et les récepteurs contreparties de NKR sont naturellement exprimés par les cellules NK et par des sous-populations de cellules T. Plusieurs de ces récepteurs peuvent être exprimés par une même cellule. Tous ces récepteurs, qu'ils soient inhibiteurs (*i.e.* NKR) ou qu'ils soient activateurs ou non inhibiteurs (*i.e.* contreparties de NKR), ont en commun d'avoir pour ligand des molécules qui ne sont pas dérivées d'antigène : les ligands des récepteurs NKR et des récepteurs contreparties de NKR sont des molécules du CMH de classe I.

La reconnaissance de son ligand par un récepteur NKR déclenche la transduction à la cellule d'un message visant à inhiber son activité, *e.g.* diminution ou arrêt de la cytolyse, de la sécrétion de cytokines, alors que la reconnaissance de son ligand par un récepteur contrepartie de NKR y induit un message activateur, ou à tout le moins non inhibiteur. A la résultante entre récepteurs NKR et récepteurs contreparties de NKR ainsi activés par leurs ligands, correspond un signal, globalement négatif ou positif, d'activation des cellules NK et/ou T qui les expriment.

Les récepteurs NKR et leurs contreparties participent ainsi au contrôle, positif ou négatif, des réactions allogéniques d'un système immunitaire donné vis-à-vis de ce qu'il considère alors comme non-soi par exemple, des cellules cancéreuses ou infectées, ou bien encore des cellules de greffe ou transplantation

allo- ou xéno-génique.

Les récepteurs NKR et leurs contreparties participent en effet aux réactions entre hôte et greffon lors d'une greffe (ou transplantation) de cellules, tissu ou organe qui présente(nt) un certain degré d'incompatibilité antigénique avec l'hôte. L'implication de récepteurs NKR et de leurs contreparties dans la tolérance envers des greffes incompatibles, et dans l'effet sélectif de lyse de cellules malignes parfois observé après greffe de moelle osseuse, ou effet GVL (*Graft Versus Leukemia*), a en effet été démontrée *in vivo* (cf. Cambiaggi *et al.* 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, p. 8088-8092 ; Albi *et al.* 1996, Blood, vol. 87, n°9, p. 3993-4000).

Or, les moyens pouvant actuellement être mis en oeuvre dans un contexte médical ne permettent pas de documenter l'ensemble des répertoires d'un patient, d'un organe, d'un tissu ou de cellules.

C'est ainsi qu'actuellement, seule la compatibilité des molécules HLA-A, HLA-B et HLA-DR du donneur et du receveur est vérifiée préalablement à une greffe ou transplantation allo- ou xéno-génique. Ces critères de compatibilité n'apparaissent toutefois pas comme suffisants. Des traitements immunosuppresseurs (par exemple, à base de cyclosporine) doivent compléter ces procédures de greffe ou transplantation de manière à inhiber le système immunitaire du patient. De tels traitements sont à hauts risques pour le patient qui est alors susceptible de développer des infections opportunistes. Ces traitements immunosuppresseurs doivent de plus être maintenus à un certain niveau pendant plusieurs années, et le patient doit alors résister aux effets délétères des médicaments. Finalement, la réussite de telles procédures de greffe ou transplantation reste incertaine. En effet, des rejets de greffe de la part du receveur, ou bien encore, dans le cas de greffes comprenant des cellules immuno-compétentes, des réactions du greffon contre l'hôte (effet GVH, *Graft Versus Host*) sont malgré tout observés. De telles réactions de rejet ou de GVH conduisent généralement à de très sévères lésions;

actuellement, elles ne peuvent toutefois être totalement écartées, et donc prévenues.

Des effets bénéfiques inattendus de greffes allogéniques ont par ailleurs parfois été observés : des greffes allogéniques de moelle osseuse sur des patients leucémiques aplasiques ont parfois conduit à un effet thérapeutique anti-tumoral par lyse des cellules malignes du receveur et préservation de ses cellules saines. Cet effet thérapeutique sélectif, dans lequel sont impliquées les cellules NK et T, est désigné par GVL (*Graft Versus Leukemia*). Potentiellement, une greffe (ou une transplantation) de tissu hématopoïétique en général, et de moelle osseuse en particulier, peut conduire à un effet thérapeutique dans le cadre de malignités hématologiques telles qu'une leucémie, par lyse sélective de celles des cellules du receveur qui ne présentent plus les antigènes d'histocompatibilité présentés par les cellules saines. Les moyens actuellement disponibles pour le milieu médical ne permettent toutefois pas de prédire si l'organe ou le tissu considéré exercera un effet sélectif GVL pour le receveur considéré. Bien que connu, l'effet sélectif GVL ne peut donc actuellement être mis à profit dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse.

Les moyens actuellement développés dans le cadre de recherches expérimentales afin de documenter les différents répertoires de cellules humaines ou animales ne permettent par ailleurs pas de documenter précisément le répertoire en récepteurs NKR et en récepteurs contreparties de NKR : l'identité précise de chaque récepteur NKR ou contrepartie de NKR ne peut être déterminée. Du fait de la forte homologie, en particulier au niveau extracytoplasmique, entre un récepteur NKR et un récepteur contrepartie de ce NKR (*e.g.* jusqu'à 96% d'homologie entre KIR et KAR), l'utilisation d'anticorps ne permet en effet souvent pas de discriminer entre des NKR qui sont inhibiteurs et leurs contreparties à fonctions activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices. Les amorces oligonucléotidiques actuellement disponibles ne permettent quant à

elles pas la mise en oeuvre d'une amplification en chaîne par polymérase capable de discriminer entre par exemple un NKR p58.1 et un NKR p58.2, ou entre un NKR p70.INH et un NKR p140.INH. Finalement, pour documenter précisément le répertoire en immunorécepteurs NKR et en leurs contreparties, il faut actuellement avoir recours après une étape de purification des récepteurs visés (*e.g.* par FACScan), à une étape de séquençage nucléotidique. La documentation du répertoire NKR /contreparties de NKR n'est donc actuellement pas réalisable en routine dans un contexte de type médical. Le niveau de stimulation et d'inhibition des programmes d'activation des cellules NK et T, et donc le potentiel de résistance d'un individu vis-à-vis du développement d'infections microbiennes ou parasitaires, de maladies auto-immunes, ou bien encore de cellules malignes, ne peut donc être mesuré. Il résulte également de cette absence de moyens adaptés pour la documentation des répertoires NKR/contreparties de NKR que les effets sélectifs de type GVL ne peuvent être utilisés en thérapie, et que les réactions GVH ou de rejets lors de greffes ou de transplantations allo- ou xéno-géniques ne peuvent être complètement écartées.

La présente invention propose donc des moyens permettant de documenter, pour un échantillon biologique donné, les répertoires en immunorécepteurs NKR et en immunorécepteurs contreparties activatrices ou à tout le moins non inhibitrices de récepteurs NKR. Ces moyens permettent notamment de distinguer aisément entre un récepteur NKR et sa contrepartie activatrice ou non inhibitrice, ainsi que de distinguer entre différents récepteurs NKR, ou entre différentes contreparties de NKR. Elle vise également les applications biologiques, et en particulier médicales et vétérinaires, de ces moyens. L'un des aspects essentiels selon l'invention consiste à considérer l'ensemble des immunorécepteurs NKR et contreparties de NKR comme un répertoire, c'est-à-dire comme un ensemble cohérent, formant une unité par rapport à un type d'activité, en l'occurrence, de manière particulièrement avantageuse, le contrôle de l'activation lymphocytaire de

l'homme ou l'animal dont est issu ledit échantillon biologique (contrôle négatif pour le répertoire des récepteurs NKR, contrôle positif pour le répertoire des contreparties de NKR). L'invention fournit, pour la première fois, des moyens permettant de documenter, en routine dans un contexte médical ou vétérinaire, des répertoires NKR et/ou contreparties de NKR, de manière à pouvoir analyser rapidement et efficacement des situations physiologiques et pathologiques liées à ces répertoires.

Les moyens selon l'invention présentent notamment l'avantage d'être aisément utilisables dans un contexte médical ou vétérinaire, par exemple en hôpital ou clinique.

La présente invention a pour objet une méthode *in vitro* de documentation d'un répertoire en immunorécepteur(s) NKR comprenant notamment les récepteurs KIR p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH, et les récepteurs NKG2A et NKG2B, et/ou d'un répertoire en immunorécepteur(s) contrepartie(s) de NKR, comprenant notamment les récepteurs KAR p50.1, p50.2, p70.ACT, p140.ACT, et les récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F, ces immunorécepteurs étant ci-après désigné(s) récepteur(s) cible(s), caractérisée en ce qu'elle comprend :

- i. l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides, l'un étant désigné oligonucléotide 3' et l'autre oligonucléotide 5', les oligonucléotides 3' et 5' d'une même dite paire étant tous deux capables, dans des conditions d'hybridation correspondant à une incubation pendant 1 min dans un tampon [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM] à une température comprise entre 50°C et 65°C environ, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, mais ne s'hybridant pas, dans les mêmes conditions d'hybridation, avec l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR, ou respectivement d'un récepteur NKR, contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible,
- ii. la mise en contact de populations ADN ou ADNc d'un échantillon

biologique d'origine humaine ou animale pour lequel on souhaite documenter le répertoire en immunorécepteur(s) cible(s), avec un excès d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' selon i. dans des conditions favorables à l'hybridation de cette paire oligonucléotides 3' et 5' sur les ADN ou sur les ADNc de l'échantillon biologique, et

iii. la détection des hybrides éventuellement formés entre ces ADN ou ADNc et la ou les paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5'.

Par contrepartie fonctionnelle d'un récepteur, nous entendons dans la présente demande un récepteur à structure homologue, en particulier au niveau extracytoplasmique, mais à fonction différente : par exemple, une contrepartie fonctionnelle du récepteur NKR p58.1 est le récepteur contrepartie de NKR p50.1, et réciproquement; de même le récepteur NKR p58.2 et le récepteur contrepartie de NKR p50.2 sont l'un pour l'autre des contreparties fonctionnelles.

La présente méthode permet donc notamment de distinguer un récepteur NKR (ou contrepartie de NKR) d'un récepteur contrepartie fonctionnelle de ce récepteur.

La (ou les) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' est (sont) en particulier capables de borner, sur l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur cible qui leur correspond, une séquence d'oligonucléotides (bornes incluses) qui est absente de la séquence ADN ou ADNc d'un récepteur avec lequel elle(s) est (sont) capable(s) de ne pas s'hybrider dans les conditions d'hybridation données sous i) ci-dessus.

De manière avantageuse, ladite ou au moins une desdites paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée(s) est en outre capable, dans les mêmes conditions d'hybridation que celles définies sous i., de ne pas s'hybrider à l'ADN ou ADNc d'un récepteur, indifféremment NKR ou contrepartie de NKR, autre que ledit récepteur cible.

Selon une disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite (ou

au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.1 (ou p50.1), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p50.1 (ou respectivement p58.1) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.2 ou p50.2.

Selon une deuxième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite, ou au moins une desdites, paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.2 (ou p50.2), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p50.2 (ou respectivement p58.2) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.1 ou p50.1.

Selon une troisième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.INH (ou p70.ACT), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.ACT (ou respectivement p70.INH) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.INH ou p140.ACT.

Selon une quatrième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite, ou au moins une desdites, paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.INH (ou p140.ACT), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.ACT (ou respectivement p140.INH) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.INH ou p70.ACT.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'oligonucléotide 5'



d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) est capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR). Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la séquence de l'oligonucléotide 5' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) comprend la séquence de l'oligonucléotide 5' d'une autre dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'oligonucléotide 3' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5', utilisée pour un récepteur cible KAR, est capable, dans les mêmes dites conditions d'hybridation, de s'hybrider à l'ADN ou ADNc dudit récepteur cible KAR au niveau d'un enchaînement nucléotidique qui comprend une séquence correspondant, selon le code génétique universel, et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, à la séquence d'acides aminés Lys Ile Pro Phe Thr Ile (K I P F T I) ou Lys Leu Pro Phe Thr Ile (K L P F T I) (SEQ ID n°26 ou 27).

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KIR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5,

n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,  
un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,  
au moins un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°10, n°11, n°12, ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.

Par séquence dérivant d'une première séquence, nous entendons dans la présente demande une séquence dérivée de la première notamment par inversion, délétion, addition, ou substitution de nucléotide(s), et présentant les propriétés d'hybridation que l'acide nucléique correspondant à la première séquence présente dans les conditions i. ci-avant définies.

Selon une disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p58.1 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p58.2 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p70.INH correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de

quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p140.INH correspond à un équilibre de quatre oligonucléotides 5', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°10, n°11, n°12 ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.

Selon un autre mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KAR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon une disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p50.1 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou

une séquence en dérivant.

Selon une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p50.2 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p70.ACT correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p140.ACT correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore un autre mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2 est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°16, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°18, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°19, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID

n°17, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°20, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°21, ou une séquence en dérivant.

Selon une première disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2A (inhibiteur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°16, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une deuxième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2B (inhibiteur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°18, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une troisième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2C (activateur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°19, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une quatrième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2D (activateur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°20, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°21, ou une séquence en dérivant.

Lesdites conditions favorables à l'hybridation de la ou des paires d'oligonucléotides 3' et 5' mises en contact avec l'ADN ou l'ADNc de l'échantillon biologique correspondent avantageusement à une incubation pendant 1 min dans un tampon [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM] à une

température comprise entre 50°C et 65°C environ. De telles conditions sont en particulier présentées dans les exemples.

De manière avantageuse, les deux oligonucléotides 3' ou 5' d'une même dite paire sont chacun couplés à un marqueur, notamment couplée à un marqueur fluorescent ou radioactif, tel que du  $^{32}\text{P}$ , permettant la révélation des hybrides qu'ils forment éventuellement avec lesdites populations ADN ou ADNc dudit échantillon biologique.

De manière également avantageuse, ladite (ou lesdites) paire(s) d'oligonucléotide(s) 3' et 5' sert (servent) d'amorces respectivement 3' et 5' pour une extension par ADN polymérase, telle qu'une Taq polymérase. Des conditions favorables à une telle extension comprennent, outre l'ajout d'ADN polymérase, l'ajout des 4 dNTP (désoxyribonucléoside-triphosphate) en présence d'un tampon de type Tris-HCl.

Lesdits hybrides éventuellement formés sont alors, préalablement à leur détection, amplifiés par au moins une PCR (amplification en chaîne par polymérase; cf. les brevets EP 201 184 et EP 200 362) ou RT-PCR dans le cas d'ADNc rétrotranscrit à partir d'ARNm. Le cas échéant, lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés par "Nested PCR" (double PCR emboîtée). Des exemples de conditions favorables à l'amplification par PCR sont donnés dans les exemples.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite détection des hybrides éventuellement formés comprend en outre la résolution sur gel de polyacrylamide du mélange réactionnel issu de la mise en contact, ainsi que la révélation de la présence ou de l'absence de bandes électrophorétiques contenant lesdits hybrides éventuellement formés.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le répertoire en immunorécepteurs documenté est quantifié par référence aux quantités de b-actine mesurées sur le même échantillon biologique, ou par référence aux

quantités d'une molécule spécifique d'un type cellulaire présentes dans ledit échantillon biologique, tel que notamment les molécules CD56 pour les cellules NK.

La méthode selon l'invention peut être appliquée à la documentation d'un répertoire génotypique en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR : l'étape ii. de mise en contact définie ci-dessus est alors réalisée avec les populations ADN génomique de l'échantillon biologique.

La méthode selon l'invention peut également être appliquée à la documentation d'un répertoire d'expression en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR : l'étape ii. de mise en contact définie ci-dessus est alors réalisée avec les populations ADNc, rétro-transcrites des populations ARNm de l'échantillon biologique.

Des échantillons biologiques d'origine humaine ou animale particulièrement appropriés à la mise en oeuvre de la méthode selon l'invention comprennent du sang périphérique, de la moelle osseuse, des lymphocytes, des cellules NK et/ou T, des cellules transgéniques exprimant des immunorécepteurs, une fraction isolée à partir de ces échantillons.

La méthode selon l'invention peut être notamment appliquée au criblage d'une banque d'organes, de tissus ou de cellules.

Elle permet ainsi une meilleure prévision :

- de l'acceptation ou de rejet, par un homme ou un animal, de cellules, d'un tissu ou d'un organe génétiquement différent(es),
- de l'inocuité ou de la pathogénicité (effet GVH), pour un homme ou un animal, d'une greffe ou transplantation, en particulier de cellules, tissu, ou organe génétiquement différent(es),
- d'un effet potentiel de type GVL que des cellules, un tissu ou un organe génétiquement différent(es) pourraient exercer sur un homme ou animal.

La méthode selon l'invention permet également le suivi de l'éventuelle

apparition de telles réactions après greffe ou transplantation allo- ou xénogénique.

La méthode selon l'invention peut également être appliquée à la détermination de l'état d'activation de cellules NK et/ou T à un instant donné chez un animal ou un homme. Elle permet alors la prévision ou le suivi de l'état de résistance d'un animal ou d'un homme vis-à-vis d'une infection virale, telle qu'une infection par un VIH, d'une infection parasitaire, telle que la malaria, d'une infection bactérienne, vis-à-vis d'une maladie auto-immune, telle que la polyarthrite rhumatoïde, ou bien encore vis-à-vis du développement de cellules malignes telles que des cellules leucémiques. L'utilisation prévisionnelle de la méthode selon l'invention est d'un intérêt particulier dans le cadre d'épidémies.

La méthode selon l'invention peut également être avantageusement appliquée au criblage de médicaments actifs vis-à-vis de maladies infectieuses, de maladies auto-immunes, ou de maladies tumorales.

La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en oeuvre de ladite méthode comprenant dans un récipient, au moins une dite paire d'oligonucléotides, les réactifs pour la réalisation de ladite ou lesdites méthode(s) tels que tampon, marqueur (éventuellement couplé aux oligonucléotides de la dite paire), ainsi qu'un mode d'emploi.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront encore à travers les exemples de réalisation suivants, donnés à titre indicatif et non limitatifs.

Lesdits exemples font référence aux Figures 1 et 2 :

La Figure 1 représente les produits issus d'une amplification par PCR (amplification en chaîne par polymérase après RT transcription enzymatique inverse à l'aide de paires d'oligonucléotides selon l'invention servant d'amorces), des séquences codantes pour p50.2 (Fig. 1A) et p58.2 (Fig. 1B) dans des cellules NK humaines;

La Figure 2 représente les produits issus d'une amplification par PCR de la



séquence codante pour p50.2 à partir du DNA génomique de souris transgéniques p50.2<sup>+</sup>.

Exemple 1 : Documentation du répertoire NKR/contreparties de NKR exprimé par une population de cellules NK humaines (RT-PCR).

### 1. Préparation des ARN

Des préparations ARN ont été réalisées à partir de cellules NK humaines clonées et phénotypées p50.2<sup>+</sup> et/ou p58.2<sup>+</sup>. La technique immunologique ne permet pas de documenter précisément un tel répertoire : l'anticorps GL183 (Immunotech) reconnaît à la fois le récepteur NKR inhibiteur p58.2 et sa contrepartie activatrice p50.2. Des cellules NK humaines clonées et phénotypées p50.2<sup>-</sup> et p58.2<sup>-</sup> à l'aide de l'anticorps GL183 servent de témoins négatifs.

Les préparations ARN sont réalisées comme suit.

### Extraction

100 µl de Trizol (Gibco BRL catégorie n°15596-026) ont été ajoutés à 10<sup>6</sup> cellules. On mélange en pipetant plusieurs fois, sans utiliser de mélangeur à vortex. On laisse la solution 5 minutes à température ambiante puis on ajoute 20 µl de chloroforme sans alcool isoamylique. On mélange à nouveau sans utiliser de mélangeur à vortex et on laisse la solution se reposer 5 minutes à température ambiante. On centrifuge alors à 4°C pendant 15 minutes de manière à bien séparer la phase organique inférieure, qui contient l'ADN, de la phase aqueuse supérieure qui contient l'ARN. On récupère la phase aqueuse sans perturber l'interface entre phase aqueuse et phase organique.

### Précipitation

50 µl d'isopropanol sont ajoutés à la phase aqueuse et on laisse l'ARN précipiter pendant 15 minutes à température ambiante. On centrifuge alors pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé, et le culot est lavé avec 100 µl d'éthanol à 70%. Après centrifugation pendant 5 minutes à 4°C (7500 g), on laisse sécher à l'air libre (sans sécher sous vide). Le culot d'ARN est remis en

suspension dans 20 ml d'H<sub>2</sub>O.

## 2. Préparation des paires d'oligonucléotides

Le tableau 1 ci-dessous présente les paires d'oligonucléotides utilisées. Sont ici rapportés les résultats relatifs à l'utilisation des paires d'oligonucléotides C (SEQ ID n°4 en tant qu'oligonucléotide 5' et un équimélange de SEQ ID n°5, n°2, n°6 et n°7 en tant qu'oligonucléotide 3') et D (SEQ ID n°8 en tant qu'oligonucléotide 5' et SEQ ID n°3 en tant qu'oligonucléotide 3') présentées dans le tableau 1. Les séquences ADNc, sur la base desquelles ces paires d'oligonucléotides ont été mises au point, sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous (nom des clones ADNc et numéro d'accès sur Genbank). Pour chaque paire d'oligonucléotides, ont ainsi été pris en compte les variants alléliques et les variants d'excision-épissage (épissage alternatif) connus d'un même récepteur.

Chaque paire d'oligonucléotides est construite, après alignement des séquences ADNc connues des différents variants d'un même récepteur cible (*e.g.* le KIR p58.2), de manière à ce que cette paire puisse déterminer, sur l'ensemble de ces variants, les bornes d'un fragment consensus, sans pour autant pouvoir faire de même sur un quelconque variant du récepteur contrepartie du récepteur cible (*e.g.* le KAR p50.2). La séquence de chaque oligonucléotide d'une même paire est ensuite optimisée de manière à ce que la température d'anneilage (annealing en anglais) de chacune d'elles soit proche (*e.g.*  $\Delta T \leq 5^{\circ}\text{C}$ ).

Chaque oligonucléotide présente en effet une température d'anneilage (ou d'hybridation) qui lui est propre. Cette température d'anneilage est fonction du rapport  $R = \frac{G + C}{\text{nombre total de bases}} \times 100$  et de la longueur de l'oligonucléotide  $(A + T + G + C)$

considéré, selon la formule : Température d'anneilage (ou d'hybridation) d'un oligonucléotide =

$$T_m = 69,3 + 0,41(R) - \frac{650}{\text{longueur en pb}} \text{ (en } ^{\circ}\text{C)}$$

Or, dans une réaction de type amplification en chaîne par polymérase les oligonucléotides d'une même paire doivent pouvoir tous deux s'anneler au récepteur cible dans des conditions de réaction communes, ceci afin de servir d'amorces à l'amplification du fragment consensus. Si les oligonucléotides d'une même paire présentent des températures propres d'annelage proches (*e.g.* 54°C et 56°C), ils pourront s'hybrider au récepteur cible, sans pour autant s'hybrider au récepteur contrepartie correspondant, à une température de 54°C ou 55°C.

Si les oligonucléotides d'une même paire présentent par contre des températures propres d'annelage très distantes (*e.g.* 49°C et 56°C), la réaction d'hybridation au récepteur cible est préférentiellement conduite à la plus basse des deux températures (*e.g.* 49°C ou 50°C), ce qui permet de maintenir la reconnaissance de sa cible nucléotidique par l'oligonucléotide dont la température propre d'annelage est la plus basse. Dans cette situation, une diminution de spécificité peut toutefois intervenir : il peut être observé que certaines paires d'oligonucléotides parviennent, dans de telles conditions de température, à s'hybrider au récepteur-contrepartie du récepteur cible. Une manière de remédier à cette perte de spécificité consiste à augmenter la longueur de l'oligonucléotide dont la température propre d'annelage est la plus basse, sans faire perdre à la paire d'oligonucléotides considérée sa spécificité.

### 3. Amplification en chaîne par polymérase après transcription enzymatique inverse (RT-PCR)

5 µg d'ARN totaux sont transcrits en ADNc par incubation avec une transcriptase inverse (RT) à l'aide du kit First Strand DNA-Ready to go (Pharmacia). 10 µl d'ADNc sur les 33 µl obtenus sont mis en contact avec les paires d'oligonucléotides C et D qui servent alors d'amorces (cf. tableau 1): 10 µl de produit issu de RT; Tampon PCR 10X : 10µl; MgCl<sub>2</sub> 50mM; dXTP 10 mM; Oligonucléotides 3' à 10 µM : 5 µl; Oligonucléotide 5' 10 µM : 5 µl; Taq polymérase : 0,5 µl; H<sub>2</sub>O : qsp 100 µl. L'amplification par PCR (DNA engine

PTC 200, MJ Research, Massachussets) est réalisée en suivant les étapes suivantes :

- étape n°1 (dénaturation initiale) : 5 min à 94°C,
- étape n°2 : 35 cycles comprenant
  - a) dénaturation 1 min à 94°C
  - b) anelage 1 min à 55°C pour la paire C et 50°C pour la paire D d'oligonucléotides,
  - c) extension 1 min à 72°C,
- étape n°3 : (extension finale) :  
1 min à 72°C.

La durée de l'extension 2c peut être augmentée si le fragment à amplifier a une grande taille (*e.g.* supérieure à 1000-1400pb environ).

La température de l'étape d'anelage 2b dépend de la paire d'oligonucléotides utilisés comme amorces (*cf.* point 2. ci-avant). Elle correspond à une température consensus entre les températures propres d'anelage de chacun des deux oligonucléotides faisant paire (température moyenne ou température la plus basse des deux). Cette température est généralement comprise entre 45°C et 70°C, préférentiellement entre 50°C et 65°C.

10 µl des produits issus de l'amplification par RT-PCR sont résolus par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en parallèle avec des marqueurs de poids moléculaires (M).

Les résultats sont illustrés sur les figures 1A et 1B.

La figure 1 illustre l'amplification par PCR après RT (transcription enzymatique inverse) des séquences codantes pour p58.2 et p50.2 de cellules NK humaines.

En figure 1A est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par RT-PCR après mise en contact de la paire d'amorces D selon l'invention (*cf.* tableau 1) avec les populations ADNc de

cellules NK humaines phénotypées  $p50.2^+$  et  $p58.2^+$  (piste +) à l'aide de l'anticorps GL183, ou avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées  $p50.2^-$  et  $p58.2^-$  (piste -) à l'aide de ce même anticorps GL183. En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaire.

En figure 1B, est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par RT-PCR après mise en contact de la paire d'amorces C selon l'invention (cf. tableau 1) avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées  $p50.2^+$  et  $p58.2^+$  (piste +) à l'aide de l'anticorps GL183, ou avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées  $p50.2^-$  et  $p58.2^-$  (piste -) à l'aide de ce même anticorps GL183. En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaire.

Il peut être observé que les paires d'oligonucléotides C et D selon l'invention permettent de reconnaître respectivement un phénotype, respectivement,  $p58.2^+$  et  $p50.2^+$ , en reconnaissant un fragment de, respectivement, 653 pb et 533pb. La méthode selon l'invention permet donc de discriminer entre un phénotype  $p58.2^+$  (récepteur KIR, à fonction inhibitrice) et un phénotype  $p50.2^+$  (récepteur KAR contrepartie de  $p58.2$ , à fonction activatrice), ce qui n'était jusqu'à présent pas réalisable sous séquençage.

Exemple 2 : Documentation du répertoire génétique (potentiel) NKR/contreparties de NKR d'une population de splénocytes de souris transgéniques  $p50.2^+$  (PCR).

#### 1 - Préparation des ADN

Des préparations ADN ont été réalisées à partir de splénocytes de souris transgéniques  $p50.2^+$ . La technique immunologique ne permet pas de déterminer si de tels splénocytes sont  $p50.2^+$  (récepteur KAR, activateur) ou  $p58.2^+$  (récepteur KIR, inhibiteur, ou bien encore  $p50.2^+$  et  $p58.2^+$ ). Des splénocytes de souris non transgéniques ( $p50.2^-$ ) servent de témoins négatifs.

### Extraction

Cette étape est réalisée comme décrit en exemple 1. Les ADN étant contenus dans la phase organique inférieure, c'est ici cette phase qui est récupérée après avoir éliminé la phase aqueuse et un peu d'interface.

### Précipitation

On ajoute 30 µl d'éthanol à 100% et on laisse reposer 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation pendant 5 minutes à 4°C (2 000g), on jette le surnageant et on lave le culot avec 100 µl de citrate de sodium 0,1M dans de l'éthanol à 10%. On laisse 30 minutes à température ambiante en mélangeant de temps en temps. On centrifuge pendant 5 minutes à 4°C (2 000g). On répète ce lavage une seconde fois.

Le culot d'ADN obtenu est remis en suspension dans 200 µl d'éthanol à 70%. On laisse 15 minutes à température ambiante en mélangeant de temps en temps et on centrifuge pendant 5 minutes à 4°C (2 000g).

Le culot est mis à sécher brièvement sous vide (1 à 2 µg d'ADN environ sont obtenus) et est remis en suspension dans 10 µl de NaOH 8mM. En cas de présence de matériel insoluble, on microcentrifuge 10 minutes à température ambiante. On transfère le surnageant dans un nouveau tube. Le pH est neutralisé en ajoutant 1,25 µl d'Hepes 0,1 M pour 10 µl.

### 2 - Préparation des paires d'oligonucléotides

Les paires d'oligonucléotides sont préparées comme décrit en exemple 1. Sont ici rapportés les résultats relatifs à la paire D d'oligonucléotides (SEQ ID n°8 en tant qu'oligonucléotide 5' et SEQ ID n°3 en tant qu'oligonucléotide 3') selon l'invention (cf. tableau 1 ci-dessous).

### 3 - Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

L'amplification en chaîne par polymérase est réalisée comme décrit en exemple 1 en mettant en contact les préparations d'ADN génomiques obtenues avec des paires d'oligonucléotides D servant alors d'amorces.

Les produits issus de l'amplification sont résolus sur gel d'agarose à 2% en parallèle avec des marqueurs de poids moléculaires (M).

Les résultats de résolution électrophorétique sur gel d'agarose à 2% des produits issus de la PCR sont illustrés par la figure 2.

La figure 2 illustre l'amplification par PCR de la séquence codante pour p50.2 à partir du DNA génomique de splénocytes de souris transgéniques p50.2<sup>+</sup> : y est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par PCR après mise en contact de la paire d'amorces D selon l'invention (*cf.* tableau 1) avec les populations ADN de splénocytes de souris transgéniques p50.2<sup>+</sup> (pistes +) ou de souris non transgéniques p50.2<sup>-</sup> (pistes -). En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaires.

Les amorces D selon l'invention permettent de reconnaître un fragment de 533 pb présent sur l'ADN de splénocytes murins p50.2<sup>+</sup> et absent sur l'ADN de splénocytes murins p50.2<sup>-</sup>.

Des résultats comparables ont été obtenus avec les paires d'oligonucléotides A, B et E à L présentées dans le tableau 1 ci-après et ont également permis de documenter les récepteurs visés (*cf.* colonne "molécule" du tableau 1).

Les répertoires NKR et/ou contreparties de NKR ainsi documentés peuvent être, notamment à l'aide d'études biostatistiques classiques, corrélés à des situations physiologiques ou pathologiques données, liées à ces répertoires, et au contrôle de l'activation des cellules les exprimant en général.

Tableau 1

| Paire d'oligo | Molécule        | Fonction   | Tm           | Nom de l'oligo                      | Séquence de l'oligo (5'-->3')                     | Séquence                            | Oligo 5' |
|---------------|-----------------|------------|--------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|----------|
| A             | p58.EB6 (p58.1) | Inhibiteur | 56°C<br>54°C | p58.1 FOR<br>ITIM N-term BACK       | AGTCGCATGACGCAAGAC<br>CAACTGTG(T/C) (A/G)TATGTCAC | Seq ID N°1<br>Seq ID N°5,2,6,7      | Oligo 3' |
| B             | p50.EB6 (p50.1) | Activateur | 56°C<br>49°C | p58.1 FOR<br>TM-ACT BACK            | AGTCGCATGACGCAAGAC<br>GATGGTGAAGGGGATTTT          | Seq ID N°1<br>Seq ID N°3            |          |
| C             | p58.183 (p58.2) | Inhibiteur | 56°C<br>54°C | p58.2 FOR<br>ITIM N-term BACK       | GGTCCCATGATGCAAGAC<br>CAACTGTG(T/C) (A/G)TATGTCAC | Seq ID N°4<br>Seq ID N°5,2,6,7.     |          |
| D             | p50.183 (p50.2) | Activateur | 56°C<br>49°C | p58.2 FOR<br>TM-ACT BACK            | GGTCCCATGATGCAAGAC<br>GATGGTGAAGGGGATTTT          | Seq ID N°8<br>Seq ID N°3            |          |
| E             | p70.INH         | Inhibiteur | 58°C<br>54°C | p70. FOR<br>ITIM N-term BACK        | CCCGTGGTGATCATGGTC<br>CAACTGTG(T/C) (A/G)TATGTCAC | Seq ID N°9<br>Seq ID N°5,2,6,7.     |          |
| F             | p70.ACT         | Activateur | 58°C<br>49°C | p70. FOR<br>TM-ACT BACK             | CCCGTGGTGATCATGGTC<br>GATGGTGAAGGGGATTTT          | Seq ID N°9<br>Seq ID N°3            |          |
| G             | p140.INH        | Inhibiteur | 56°C<br>58°C | ITIM N-term. FOR<br>Ext C-term BACK | GTGAC(A/G)TAC(A/G)CACAGTTG<br>ACCTGACTGTGGTGCTCG  | Seq ID N°10,11,12,13<br>Seq ID N°14 |          |



Tableau I (suite)

|   |           |            |              |                                |  |                            |
|---|-----------|------------|--------------|--------------------------------|--|----------------------------|
| H | p140. ACT | Activateur | 58°C<br>49°C | p140. FOR<br>TM-ACT BACK       | ACCTACAGATGTTATGGTTCTGTT<br>GATGGTGAAGGATTTT       | Seq ID N°15<br>Seq ID N°13 |
| I | NKG2A     | Inhibiteur | 54°C<br>54°C | NKG2A FOR<br>NKG2A/ B/C. BACK  | TCTACATTAAATACAGAGGCAC<br>ATCTATAGAAAGCAGACT       | Seq ID N°16<br>Seq ID N°17 |
| J | NKG2 B    | Inhibiteur | 52°C<br>54°C | NKG2 B FOR<br>NKG2A/ B/C. BACK | ATTCCCTCACGTCATTGT<br>ATCTATAGAAAGCAGACT           | Seq ID N°18<br>Seq ID N°17 |
| K | NKG2C     | Activateur | 54°C<br>54°C | NKG2C. FOR<br>NKG2A/ B/C. BACK | AGTAAACAAAAGAGGAACCTTC<br>ATCTATAGAAAGCAGACT       | Seq ID N°19<br>Seq ID N°17 |
| L | NKG2D     | Activateur | 56°C<br>58°C | NKG2D. FOR<br>NKG2D. BACK      | AGCAAAGAGGACCAGGATTTA<br>CACAGTCCTTTGCATGCAGAT     | Seq ID N°20<br>Seq ID N°21 |
| M | CD56      |            | 51°C<br>54°C | 5' hCD56<br>3' hCD56           | ATCCAGTACACTGATGAC<br>GTCGATGGATGGTGAAGA           | Seq ID N°22<br>Seq ID N°23 |
| N | Actine    |            | 62°C<br>64°C | 5' Actine<br>3' Actine         | TACCACTGGCATCGTGATGGACT<br>TCCTTCTGCATCCTGTCGGCAAT | Seq ID N°24<br>Seq ID N°25 |

TABLEAU 2

| Paire<br>d'oligonucléotides | nom du CDNA  | Numéro<br>d'accès<br>sur<br>Genbank  |
|-----------------------------|--|--|
| A                           | cl-42<br>NKAT-1<br>cl-47.11  | U24076<br>L41267<br>U24078   |
| B                           | X98858<br>X98892<br>NKAT-7AA<br>NKAT-9AA   | X98585<br>X98892<br>L76670<br>L76672   |
| C                           | cl-43<br>NKAT-6AA<br>NKAT-2 FA<br>cl-6<br>NKAT-2<br>KIR-023GB<br>NKAT-2A B<br>NKAT-3DA       | U24075<br>L76669<br>L76663<br>U24074<br>L41268<br>U73395<br>L76662<br>L76664           |
| D                           | cl-49<br>NKAT-5<br>X89893<br>cl-39<br>NKAT-8<br>NKAT-5DA                                     | U24079<br>L41347<br>X89893<br>U24077<br>L76671<br>L76667                               |
| E                           | X94262<br>NKAT-3<br>NK HI-1<br>NK HI-2<br>KIR-103AS<br>KIR-103AST<br>cl-1.1<br>cl-11<br>cl-2 | X94262<br>L41269<br>U31416<br>U33328<br>U71199<br>U73394<br>X94373<br>U30274<br>U30273 |
| F                           | NKAT-10<br>KIR-123FM   | L76661<br>U73396   |
| G                           | NKAT-4<br>X94374<br>X93595<br>X93596<br>NKAT-4 FA<br>NKAT-4AA<br>cl-5                        | L41270<br>X94374<br>X93595<br>X93596<br>L76666<br>L76665<br>U30272                     |

Tableau 2 (suite)

|   |        |          |
|---|--------|----------|
| I | NKG2A  | X5 48 67 |
| J | NKG2 B | X5 48 68 |
| K | NKG2 C | X5 48 69 |
| L | NKG2D  | X5 48 70 |

## REVENDICATIONS

1. Méthode *in vitro* de documentation d'un répertoire en
- 5 immunorécepteur(s) NKR comprenant notamment les récepteurs KIR p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH, et les récepteurs NKG2A et NKG2B, et/ou d'un répertoire en immunorécepteur(s) contrepartie(s) de NKR, comprenant notamment les récepteurs KAR p50.1, p50.2, p70.ACT, p140.ACT, et les récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F, ces immunorécepteurs étant
- 10 ci-après désigné(s) récepteur(s) cible(s), caractérisée en ce qu'elle comprend :
- i. l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides, l'un étant désigné oligonucléotide 3' et l'autre oligonucléotide 5', les oligonucléotides 3' et 5' d'une même dite paire étant tous deux capables, dans des conditions d'hybridation correspondant à une incubation pendant 1 min dans un tampon

15 [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM] à une température comprise entre 50°C et 65°C environ, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, mais ne s'hybridant pas, dans les mêmes conditions d'hybridation, avec l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR, ou respectivement d'un récepteur NKR,

20 contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible,

  - ii. la mise en contact de populations ADN ou ADNc d'un échantillon biologique d'origine humaine ou animale pour lequel on souhaite documenter le répertoire en immunorécepteur(s) cible(s), avec un excès d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' selon i. dans des conditions favorables à

25 l'hybridation de cette paire oligonucléotides 3' et 5' sur les ADN ou sur les ADNc de l'échantillon biologique, et  - iii. la détection des hybrides éventuellement formés entre ces ADN ou ADNc et la ou les paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5'.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite ou au moins une desdites paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée(s) est en outre capable, dans les mêmes conditions d'hybridation que celles définies sous i., de ne pas s'hybrider à l'ADN ou ADNc d'un récepteur, indifféremment NKR  
5 ou contrepartie de NKR, autre que ledit récepteur cible.
3. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'oligonucléotide 5' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) est capable dans les mêmes dites conditions d'hybridation de s'hybrider à l'ADN  
10 ou à l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR).
4. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'oligonucléotide 3' d'une dite paire d'oligonucléotides  
15 3'et 5', utilisée pour un récepteur cible KAR, est capable, dans les mêmes dites conditions d'hybridation, de s'hybrider à l'ADN ou ADNc dudit récepteur cible KAR au niveau d'un enchaînement nucléotidique qui comprend une séquence correspondant, selon le code génétique universel, et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, à la séquence d'acides  
20 aminés Lys Ile Pro Phe Thr Ile (K I P F T I) ou Lys Leu Pro Phe Thr Ile (K L P F T I) (SEQ ID n°26 ou 27).
5. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KIR est  
25 choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :  
un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
- au moins un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°10, n°11, n°12, ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.
6. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KAR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
  - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
  - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
  - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.
7. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2 est

- choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°16, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,
- 5 un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°18, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°19, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17,
- 10 ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°20, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°21, ou une séquence en dérivant.
08. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,
- 15 caractérisée en ce que les deux oligonucléotides 3' ou 5' d'une même dite paire sont chacun couplés à un marqueur, notamment couplée à un marqueur fluorescent ou radioactif, tel que du  $^{32}\text{P}$ , permettant la révélation des hybrides qu'ils forment éventuellement avec lesdites populations ADN ou ADNc dudit échantillon biologique.
- 20 9. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou lesdites) paire(s) d'oligonucléotide(s) 3' et 5' sert (servent) d'amorces respectivement 3' et 5' pour une extension par ADN polymérase.
10. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,
- 25 caractérisée en ce que lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés par au moins une PCR préalablement à leur détection.
11. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés

par "Nested PCR" (double PCR emboîtée).

12. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite détection des hybrides éventuellement formés comprend en outre la résolution sur gel de polyacrylamide du mélange  
5 réactionnel issu de la mise en contact, ainsi que la révélation de la présence ou de l'absence de bandes électrophorétiques contenant lesdits hybrides éventuellement formés.
13. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la documentation d'un répertoire  
10 génotypique en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR.
14. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la documentation d'un répertoire d'expression en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs  
15 contreparties de NKR.
15. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit échantillon biologique d'origine humaine ou animale est du sang périphérique, de la moelle osseuse, des lymphocytes, des cellules NK et/ou T, des cellules transgéniques exprimant des  
20 immunorécepteurs, une fraction isolée à partir de ces échantillons.
16. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée au criblage d'une banque d'organes, de tissus ou de cellules.
17. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de  
25 l'acceptation ou du rejet, par un homme ou un animal, de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).
18. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,



caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de l'inocuité ou de la pathogénicité (GVH) d'une greffe ou transplantation, par un homme ou un animal, de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

5 19. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi, pour un homme ou un animal, d'un effet de type GVL de la part de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

20. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
10 caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détermination de l'état d'activation de cellules NK et/ou T à un instant donné chez un animal ou un homme.

21. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de l'état de  
15 résistance d'un animal ou d'un homme vis-à-vis d'une infection virale, telle qu'une infection par un VIH, d'une infection parasitaire, telle que la malaria, d'une infection bactérienne, vis-à-vis d'une maladie auto-immune, telle que la polyarthrite rhumatoïde, ou bien encore vis-à-vis du développement de cellules malignes telles que des cellules leucémiques.

20 22. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée au criblage de médicaments actifs vis-à-vis de maladies infectieuses, de maladies auto-immunes, ou de maladies tumorales.

23. Kit pour la mise en oeuvre de la méthode selon l'une quelconque des  
25 revendications 1 à 22, caractérisé en ce qu'il comprend, dans un récipient, au moins une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5', les réactifs pour la réalisation de ladite ou lesdites méthode(s) tels que tampon, marqueur (éventuellement couplé aux oligonucléotides de la dite paire), ainsi qu'un mode d'emploi.

1/2

FIGURE 1B

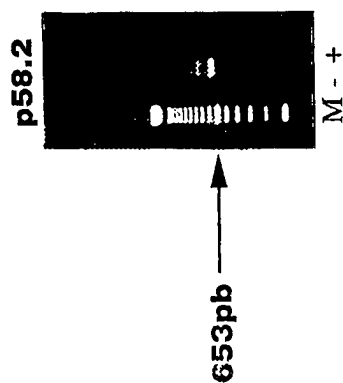


FIGURE 1A

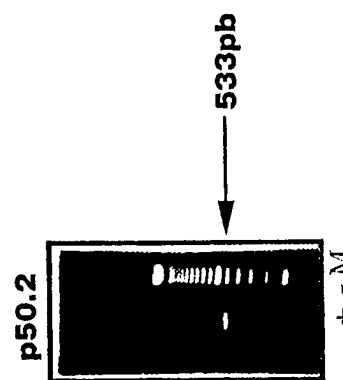
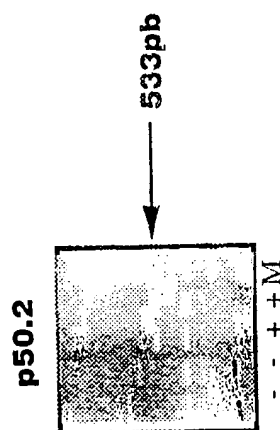


FIGURE 1

2/2

FIGURE 2



## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: I. N. S. E. R. M.
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Méthode de documentation en immunorécepteurs NKR et en immunorécepteurs contreparties de NKR

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 27

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## 2. INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 13 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

## (vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: p58.1 FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGTCGCATGA CGCAAGAC

18

## 3. INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

## (vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CAACTGTGTG TATGTCAC

18

## 4. INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: TM-ACT BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GATGGTGAAA GGGATTTT

18

(5) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p58.2.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGTCCCATGA TGCAAGAC

18

(6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CAACTGTGTA TATGTCAC

18

(7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CAACTGTGCA TATGTCAC

18

## (8) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAACTGTGCG TATGTCAC

18

## (9) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: lineaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p58.2 FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGTCCCATGA TGCAAGAC

18

## (10) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p70. FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCCGTGGTGA TCATGGTC

18

## (11) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:  
GTGACATACA CACAGTTG 18
- (12) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:  
GTGACATACG CACAGTTG 18
- (13) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:  
GTGACGTACA CACAGTTG 18
- (14) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:  
GTGACGTACG CACAGTTG 18
- (15) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: Ext C-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

ACCTGACTGT GGTGCTCG

18

(16) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p140.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

ACCTACAGAT GTTATGGTTC TGTT

24

(17) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2A.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

TCTACATTAA TACAGAGGCA C

21

(18) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2A/ B/C. BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

ATCTATAGAA AGCAGACT

18

(19) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide



- (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2 B FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:  
ATTCCCTCAC GTCATTGT 18
- (20) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 21 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2C.FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:  
AGTAAACAAA GAGGAACCTT C 21
- (21) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 21 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2D.FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:  
AGCAAAGAGG ACCAGGATTT A 21
- (22) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 21 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2D. BACK
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:  
CACAGTCCTT TGCATGCAGA T 21
- (23) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: 5' hCD56
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:  
ATCCAGTACA CTGATGAC 18
- (24) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: 3' hCD56
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:  
GTCGATGGAT GGTGAAGA 18
- (25) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 23 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: 5' Actine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:  
TACCACTGGC ATCGTGATGG ACT 23
- (26) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 23 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: 3' Actine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:  
TCCTTCTGCA TCCTGTCGGC AAT 23
- (27) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 6 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (C) NOMBRE DE BRINS:
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (C) INDIVIDU/ISOLE:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26

Lys Ile Pro Phe Thr Ile  
1 5

(28) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 6 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (C) NOMBRE DE BRINS:
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (C) INDIVIDU/ISOLE:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27

Lys Leu Pro Phe Thr Ile  
1 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 98/02244

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.    |
|----------|--|--------------------------|
| X        | <p>MINGARI M. C. ET AL.,:</p> <p>"Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-a as the only HLA class I-specific inhibitory receptor"</p> <p>EUR. J. IMMUNOLOGY,</p> <p>vol. 27, - June 1997 pages 1374-1380,</p> <p>XP002072518</p> <p>the whole document &amp; p.1375, 2.6;</p> <p>discussion</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | <p>1,2,17,</p> <p>23</p> |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 1999

Date of mailing of the international search report

03/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/FR 98/02244

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X        | <p>HIBY S.E. ET AL.,: "Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing"</p> <p>MOL. IMMUNOLOGY,<br/>vol. 34, no. 5, - April 1997 pages 419-430, XP002090558<br/>see whole doc, esp. abstract and table 1 and 3</p> <p>---</p>                | 1-4,23                |
| X        | <p>ADAMKIEWICZ T. V. ET AL.,: "Natural killer lectin-like receptors have divergent carboxy-termini, distinct from C-type lectins"</p> <p>IMMUNOGENETICS,<br/>vol. 39, - 1994 page 218 XP002072519<br/>see the whole document</p> <p>---</p>   | 1,23                  |
| X        | <p>YABE T. ET AL.,: "A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins"</p> <p>IMMUNOGENETICS,<br/>vol. 37, no. 6, - 1993 pages 455-460, XP002072520<br/>see esp. M&amp;M, discussion</p> <p>---</p>  | 1,23                  |
| A        | <p>BOTTINO C. ET AL.,: "A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation"</p> <p>EUR. J. IMMUNOL.,<br/>vol. 26, - August 1996 pages 1816-1824, XP002072521<br/>see the whole document</p> <p>---</p> |                       |
| A        | <p>CAMBIAGGI A. ET AL.,: "Natural killer cell acceptance of H-2 mismatch bone marrow grafts in transgenic mice expressing HLA-Cw3 specific killer cell inhibitory receptor (CD158b)"</p> <p>PROC. ACAD. SCI. USA,<br/>vol. 94, - July 1997 pages 8088-8092, XP002072522<br/>see the whole document</p> <p>-----</p>   |                       |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Classification internationale No  
PCT/FR 98/02244

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| X         | <p>MINGARI M. C. ET AL.,:</p> <p>"Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-a as the only HLA class I-specific inhibitory receptor"</p> <p>EUR. J. IMMUNOLOGY, vol. 27, - juin 1997 pages 1374-1380, XP002072518</p> <p>le doc. en entier, et p.1375, 2.6; discussion</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1,2,17, 23                    |



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 janvier 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Müller, F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

e internationale No

PCT/FR 98/02244

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                               |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
| X   | <p>HIBY S.E. ET AL.,: "Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing"</p> <p>MOL. IMMUNOLOGY,<br/>vol. 34, no. 5, - avril 1997 pages 419-430, XP002090558<br/>see whole doc, esp. abstract and table 1 and 3</p> <p>---</p>                  | 1-4,23                        |
| X   | <p>ADAMKIEWICZ T. V. ET AL.,: "Natural killer lectin-like receptors have divergent carboxy-termini, distinct from C-type lectins"</p> <p>IMMUNOGENETICS,<br/>vol. 39, - 1994 page 218 XP002072519<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p>   | 1,23                          |
| X   | <p>YABE T. ET AL.,: "A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins"</p> <p>IMMUNOGENETICS,<br/>vol. 37, no. 6, - 1993 pages 455-460, XP002072520<br/>see esp. M&amp;M, discussion</p> <p>---</p>  | 1,23                          |
| A   | <p>BOTTINO C. ET AL.,: "A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation"</p> <p>EUR. J. IMMUNOL.,<br/>vol. 26, - août 1996 pages 1816-1824, XP002072521<br/>voir le document en entier</p> <p>---</p> |                               |
| A   | <p>CAMBIAGGI A. ET AL.,: "Natural killer cell acceptance of H-2 mismatch bone marrow grafts in transgenic mice expressing HLA-Cw3 specific killer cell inhibitory receptor (CD158b)"</p> <p>PROC. ACAD. SCI. USA,<br/>vol. 94, - juillet 1997 pages 8088-8092, XP002072522<br/>voir le document en entier</p> <p>-----</p>                                      |                               |

422 Rec'd PCT/PTO 1 8 APR 2000

**Moyens de documentation de répertoires  
en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties  
activatrices ou non inhibitrices d'immunorécepteurs NKR**

La présente invention concerne des moyens permettant de documenter les répertoires d'un individu humain ou animal en immunorécepteurs NKR (*Natural Killer Receptor*) du type des immunoglobulines ou du type des lectines, et en immunorécepteurs contreparties activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices, d'immunorécepteurs NKR. Elle vise également leurs applications biologiques.

Les fonctions immunitaires d'un homme ou d'un animal sont définies par plusieurs catégories de molécules hautement diversifiées, telles que notamment le système des groupes sanguins ABO, la famille des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, appelé chez l'homme, système HLA - *Human Leukocyte Antigen*-), la famille des récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR). L'ensemble des molécules qu'un individu adulte exprime, ou est capable d'exprimer, pour chacune de ces différentes familles constitue, exception faite des vrais jumeaux, un répertoire évolutif qui lui est propre et qui intervient dans la reconnaissance du soi ou du non-soi.

D'autres grands répertoires ont été plus récemment identifiés. Il s'agit du répertoire en récepteurs NKR de type immunoglobuline et du répertoire en récepteurs NKR de type lectine. Les récepteurs NKR de type immunoglobuline comprennent les récepteurs KIR (*Killer cell Inhibitory Receptor*) tels que notamment les récepteurs p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH. Les récepteurs NKR de type lectine comprennent les récepteurs inhibiteurs NKG2 tels que notamment les récepteurs NKG2A et NKG2B. L'ensemble de ces récepteurs



NKR sont à fonction inhibitrice. Des récepteurs qui leur sont hautement homologues, en particulier au niveau extracytoplasmique, assurent toutefois des fonctions activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices : il s'agit des récepteurs KAR (*Killer cell Activatory Receptor*) homologues aux récepteurs KIR, et des récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E et NKG2F homologues aux récepteurs NKG2A et NKG2B. Les récepteurs contreparties activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices, de récepteurs inhibiteurs NKR sont ci-après désignés, par souci de fluidité, contreparties de NKR.

Les récepteurs NKR et les récepteurs contreparties de NKR sont naturellement exprimés par les cellules NK et par des sous-populations de cellules T. Plusieurs de ces récepteurs peuvent être exprimés par une même cellule. Tous ces récepteurs, qu'ils soient inhibiteurs (*i.e.* NKR) ou qu'ils soient activateurs ou non inhibiteurs (*i.e.* contreparties de NKR), ont en commun d'avoir pour ligand des molécules qui ne sont pas dérivées d'antigène : les ligands des récepteurs NKR et des récepteurs contreparties de NKR sont des molécules du CMH de classe I.

La reconnaissance de son ligand par un récepteur NKR déclenche la transduction à la cellule d'un message visant à inhiber son activité, *e.g.* diminution ou arrêt de la cytolyse, de la sécrétion de cytokines, alors que la reconnaissance de son ligand par un récepteur contrepartie de NKR y induit un message activateur, ou à tout le moins non inhibiteur. A la résultante entre récepteurs NKR et récepteurs contreparties de NKR ainsi activés par leurs ligands, correspond un signal, globalement négatif ou positif, d'activation des cellules NK et/ou T qui les expriment.

Les récepteurs NKR et leurs contreparties participent ainsi au contrôle, positif ou négatif, des réactions allogéniques d'un système immunitaire donné vis-à-vis de ce qu'il considère alors comme non-soi par exemple, des cellules cancéreuses ou infectées, ou bien encore des cellules de greffe ou transplantation

allo- ou xéno-génique.

Les récepteurs NKR et leurs contreparties participent en effet aux réactions entre hôte et greffon lors d'une greffe (ou transplantation) de cellules, tissu ou organe qui présente(nt) un certain degré d'incompatibilité antigénique avec l'hôte. L'implication de récepteurs NKR et de leurs contreparties dans la tolérance envers des greffes incompatibles, et dans l'effet sélectif de lyse de cellules malignes parfois observé après greffe de moelle osseuse, ou effet GVL (*Graft Versus Leukemia*), a en effet été démontrée *in vivo* (cf. Cambiaggi *et al.* 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, p. 8088-8092 ; Albi *et al.* 1996, Blood, vol. 87, n°9, p. 3993-4000).

Or, les moyens pouvant actuellement être mis en oeuvre dans un contexte médical ne permettent pas de documenter l'ensemble des répertoires d'un patient, d'un organe, d'un tissu ou de cellules.

C'est ainsi qu'actuellement, seule la compatibilité des molécules HLA-A, HLA-B et HLA-DR du donneur et du receveur est vérifiée préalablement à une greffe ou transplantation allo- ou xéno-génique. Ces critères de compatibilité n'apparaissent toutefois pas comme suffisants. Des traitements immunosuppresseurs (par exemple, à base de cyclosporine) doivent compléter ces procédures de greffe ou transplantation de manière à inhiber le système immunitaire du patient. De tels traitements sont à hauts risques pour le patient qui est alors susceptible de développer des infections opportunistes. Ces traitements immunosuppresseurs doivent de plus être maintenus à un certain niveau pendant plusieurs années, et le patient doit alors résister aux effets délétères des médicaments. Finalement, la réussite de telles procédures de greffe ou transplantation reste incertaine. En effet, des rejets de greffe de la part du receveur, ou bien encore, dans le cas de greffes comprenant des cellules immuno-compétentes, des réactions du greffon contre l'hôte (effet GVH, *Graft Versus Host*) sont malgré tout observés. De telles réactions de rejet ou de GVH conduisent généralement à de très sévères lésions;

actuellement, elles ne peuvent toutefois être totalement écartées, et donc prévenues.

Des effets bénéfiques inattendus de greffes allogéniques ont par ailleurs parfois été observés : des greffes allogéniques de moelle osseuse sur des patients leucémiques aplasiques ont parfois conduit à un effet thérapeutique anti-tumoral par lyse des cellules malignes du receveur et préservation de ses cellules saines. Cet effet thérapeutique sélectif, dans lequel sont impliquées les cellules NK et T, est désigné par GVL (*Graft Versus Leukemia*). Potentiellement, une greffe (ou une transplantation) de tissu hématopoïétique en général, et de moelle osseuse en particulier, peut conduire à un effet thérapeutique dans le cadre de malignités hématologiques telles qu'une leucémie, par lyse sélective de celles des cellules du receveur qui ne présentent plus les antigènes d'histocompatibilité présentés par les cellules saines. Les moyens actuellement disponibles pour le milieu médical ne permettent toutefois pas de prédire si l'organe ou le tissu considéré exercera un effet sélectif GVL pour le receveur considéré. Bien que connu, l'effet sélectif GVL ne peut donc actuellement être mis à profit dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse.

Les moyens actuellement développés dans le cadre de recherches expérimentales afin de documenter les différents répertoires de cellules humaines ou animales ne permettent par ailleurs pas de documenter précisément le répertoire en récepteurs NKR et en récepteurs contreparties de NKR : l'identité précise de chaque récepteur NKR ou contrepartie de NKR ne peut être déterminée. Du fait de la forte homologie, en particulier au niveau extracytoplasmique, entre un récepteur NKR et un récepteur contrepartie de ce NKR (e.g. jusqu'à 96% d'homologie entre KIR et KAR), l'utilisation d'anticorps ne permet en effet souvent pas de discriminer entre des NKR qui sont inhibiteurs et leurs contreparties à fonctions activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices. Les amorces oligonucléotidiques actuellement disponibles ne permettent quant à

elles pas la mise en oeuvre d'une amplification en chaîne par polymérase capable de discriminer entre par exemple un NKR p58.1 et un NKR p58.2, ou entre un NKR p70.INH et un NKR p140.INH. Finalement, pour documenter précisément le répertoire en immunorécepteurs NKR et en leurs contreparties, il faut actuellement avoir recours après une étape de purification des récepteurs visés (*e.g.* par FACScan), à une étape de séquençage nucléotidique. La documentation du répertoire NKR /contreparties de NKR n'est donc actuellement pas réalisable en routine dans un contexte de type médical. Le niveau de stimulation et d'inhibition des programmes d'activation des cellules NK et T, et donc le potentiel de résistance d'un individu vis-à-vis du développement d'infections microbiennes ou parasitaires, de maladies auto-immunes, ou bien encore de cellules malignes, ne peut donc être mesuré. Il résulte également de cette absence de moyens adaptés pour la documentation des répertoires NKR/contreparties de NKR que les effets sélectifs de type GVL ne peuvent être utilisés en thérapie, et que les réactions GVH ou de rejets lors de greffes ou de transplantations allo- ou xéno-géniques ne peuvent être complètement écartées.

La présente invention propose donc des moyens permettant de documenter, pour un échantillon biologique donné, les répertoires en immunorécepteurs NKR et en immunorécepteurs contreparties activatrices ou à tout le moins non inhibitrices de récepteurs NKR. Ces moyens permettent notamment de distinguer aisément entre un récepteur NKR et sa contrepartie activatrice ou non inhibitrice, ainsi que de distinguer entre différents récepteurs NKR, ou entre différentes contreparties de NKR. Elle vise également les applications biologiques, et en particulier médicales et vétérinaires, de ces moyens. L'un des aspects essentiels selon l'invention consiste à considérer l'ensemble des immunorécepteurs NKR et contreparties de NKR comme un répertoire, c'est-à-dire comme un ensemble cohérent, formant une unité par rapport à un type d'activité, en l'occurrence, de manière particulièrement avantageuse, le contrôle de l'activation lymphocytaire de

l'homme ou l'animal dont est issu ledit échantillon biologique (contrôle négatif pour le répertoire des récepteurs NKR, contrôle positif pour le répertoire des contreparties de NKR). L'invention fournit, pour la première fois, des moyens permettant de documenter, en routine dans un contexte médical ou vétérinaire, des répertoires NKR et/ou contreparties de NKR, de manière à pouvoir analyser rapidement et efficacement des situations physiologiques et pathologiques liées à ces répertoires.

Les moyens selon l'invention présentent notamment l'avantage d'être aisément utilisables dans un contexte médical ou vétérinaire, par exemple en hôpital ou clinique.

La présente invention a pour objet une méthode *in vitro* de documentation d'un répertoire en immunorécepteur(s) NKR comprenant notamment les récepteurs KIR p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH, et les récepteurs NKG2A et NKG2B, et/ou d'un répertoire en immunorécepteur(s) contrepartie(s) de NKR, comprenant notamment les récepteurs KAR p50.1, p50.2, p70.ACT, p140.ACT, et les récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F, ces immunorécepteurs étant ci-après désigné(s) récepteur(s) cible(s), caractérisée en ce qu'elle comprend :

- i. l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides, l'un étant désigné oligonucléotide 3' et l'autre oligonucléotide 5', les oligonucléotides 3' et 5' d'une même dite paire étant tous deux capables, dans des conditions d'hybridation correspondant à une incubation pendant 1 min dans un tampon [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM] à une température comprise entre 50°C et 65°C environ, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, mais ne s'hybridant pas, dans les mêmes conditions d'hybridation, avec l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR, ou respectivement d'un récepteur NKR, contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible,
- ii. la mise en contact de populations ADN ou ADNc d'un échantillon

biologique d'origine humaine ou animale pour lequel on souhaite documenter le répertoire en immunorécepteur(s) cible(s), avec un excès d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' selon i. dans des conditions favorables à l'hybridation de cette paire oligonucléotides 3' et 5' sur les ADN ou sur les ADNc de l'échantillon biologique, et

iii. la détection des hybrides éventuellement formés entre ces ADN ou ADNc et la ou les paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5'.

Par contrepartie fonctionnelle d'un récepteur, nous entendons dans la présente demande un récepteur à structure homologue, en particulier au niveau extracytoplasmique, mais à fonction différente : par exemple, une contrepartie fonctionnelle du récepteur NKR p58.1 est le récepteur contrepartie de NKR p50.1, et réciproquement; de même le récepteur NKR p58.2 et le récepteur contrepartie de NKR p50.2 sont l'un pour l'autre des contreparties fonctionnelles.

La présente méthode permet donc notamment de distinguer un récepteur NKR (ou contrepartie de NKR) d'un récepteur contrepartie fonctionnelle de ce récepteur.

La (ou les) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' est (sont) en particulier capables de borner, sur l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur cible qui leur correspond, une séquence d'oligonucléotides (bornes incluses) qui est absente de la séquence ADN ou ADNc d'un récepteur avec lequel elle(s) est (sont) capable(s) de ne pas s'hybrider dans les conditions d'hybridation données sous i) ci-dessus.

De manière avantageuse, ladite ou au moins une desdites paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée(s) est en outre capable, dans les mêmes conditions d'hybridation que celles définies sous i., de ne pas s'hybrider à l'ADN ou ADNc d'un récepteur, indifféremment NKR ou contrepartie de NKR, autre que ledit récepteur cible.

Selon une disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite (ou



au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.1 (ou p50.1), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p50.1 (ou respectivement p58.1) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.2 ou p50.2.

Selon une deuxième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite, ou au moins une desdites, paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.2 (ou p50.2), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p50.2 (ou respectivement p58.2) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.1 ou p50.1.

Selon une troisième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.INH (ou p70.ACT), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.ACT (ou respectivement p70.INH) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.INH ou p140.ACT.

Selon une quatrième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite, ou au moins une desdites, paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.INH (ou p140.ACT), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.ACT (ou respectivement p140.INH) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.INH ou p70.ACT.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'oligonucléotide 5'

d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) est capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR). Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la séquence de l'oligonucléotide 5' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) comprend la séquence de l'oligonucléotide 5' d'une autre dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'oligonucléotide 3' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5', utilisée pour un récepteur cible KAR, est capable, dans les mêmes dites conditions d'hybridation, de s'hybrider à l'ADN ou ADNc dudit récepteur cible KAR au niveau d'un enchaînement nucléotidique qui comprend une séquence correspondant, selon le code génétique universel, et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, à la séquence d'acides aminés Lys Ile Pro Phe Thr Ile (K I P F T I) ou Lys Leu Pro Phe Thr Ile (K L P F T I) (SEQ ID n°26 ou 27).

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KIR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5,



n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,  
un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,  
au moins un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°10, n°11, n°12, ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.

Par séquence dérivant d'une première séquence, nous entendons dans la présente demande une séquence dérivée de la première notamment par inversion, délétion, addition, ou substitution de nucléotide(s), et présentant les propriétés d'hybridation que l'acide nucléique correspondant à la première séquence présente dans les conditions i. ci-avant définies.

Selon une disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p58.1 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p58.2 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p70.INH correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de

quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p140.INH correspond à un équilibre de quatre oligonucléotides 5', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°10, n°11, n°12 ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.

Selon un autre mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KAR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon une disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p50.1 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou

une séquence en dérivant.

Selon une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p50.2 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p70.ACT correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p140.ACT correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore un autre mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2 est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°16, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°18, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°19, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID

n°17, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°20, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°21, ou une séquence en dérivant.

Selon une première disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2A (inhibiteur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°16, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une deuxième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2B (inhibiteur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°18, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une troisième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2C (activateur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°19, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une quatrième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2D (activateur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°20, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°21, ou une séquence en dérivant.

Lesdites conditions favorables à l'hybridation de la ou des paires d'oligonucléotides 3' et 5' mises en contact avec l'ADN ou l'ADNc de l'échantillon biologique correspondent avantageusement à une incubation pendant 1 min dans un tampon [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM] à une

température comprise entre 50°C et 65°C environ. De telles conditions sont en particulier présentées dans les exemples.

De manière avantageuse, les deux oligonucléotides 3' ou 5' d'une même dite paire sont chacun couplés à un marqueur, notamment couplée à un marqueur fluorescent ou radioactif, tel que du  $^{32}\text{P}$ , permettant la révélation des hybrides qu'ils forment éventuellement avec lesdites populations ADN ou ADNc dudit échantillon biologique.

De manière également avantageuse, ladite (ou lesdites) paire(s) d'oligonucléotide(s) 3' et 5' sert (servent) d'amorces respectivement 3' et 5' pour une extension par ADN polymérase, telle qu'une Taq polymérase. Des conditions favorables à une telle extension comprennent, outre l'ajout d'ADN polymérase, l'ajout des 4 dNTP (désoxyribonucléoside-triphosphate) en présence d'un tampon de type Tris-HCl.

Lesdits hybrides éventuellement formés sont alors, préalablement à leur détection, amplifiés par au moins une PCR (amplification en chaîne par polymérase; cf. les brevets EP 201 184 et EP 200 362) ou RT-PCR dans le cas d'ADNc rétrotranscrit à partir d'ARNm. Le cas échéant, lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés par "Nested PCR" (double PCR emboîtée). Des exemples de conditions favorables à l'amplification par PCR sont donnés dans les exemples.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite détection des hybrides éventuellement formés comprend en outre la résolution sur gel de polyacrylamide du mélange réactionnel issu de la mise en contact, ainsi que la révélation de la présence ou de l'absence de bandes électrophorétiques contenant lesdits hybrides éventuellement formés.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le répertoire en immunorécepteurs documenté est quantifié par référence aux quantités de b-actine mesurées sur le même échantillon biologique, ou par référence aux

quantités d'une molécule spécifique d'un type cellulaire présentes dans ledit échantillon biologique, tel que notamment les molécules CD56 pour les cellules NK.

La méthode selon l'invention peut être appliquée à la documentation d'un répertoire génotypique en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR : l'étape ii. de mise en contact définie ci-dessus est alors réalisée avec les populations ADN génomique de l'échantillon biologique.

La méthode selon l'invention peut également être appliquée à la documentation d'un répertoire d'expression en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR : l'étape ii. de mise en contact définie ci-dessus est alors réalisée avec les populations ADNc, rétro-transcrites des populations ARNm de l'échantillon biologique.

Des échantillons biologiques d'origine humaine ou animale particulièrement appropriés à la mise en oeuvre de la méthode selon l'invention comprennent du sang périphérique, de la moelle osseuse, des lymphocytes, des cellules NK et/ou T, des cellules transgéniques exprimant des immunorécepteurs, une fraction isolée à partir de ces échantillons.

La méthode selon l'invention peut être notamment appliquée au criblage d'une banque d'organes, de tissus ou de cellules.

Elle permet ainsi une meilleure prévision :

- de l'acceptation ou de rejet, par un homme ou un animal, de cellules, d'un tissu ou d'un organe génétiquement différent(es),
- de l'inocuité ou de la pathogénicité (effet GVH), pour un homme ou un animal, d'une greffe ou transplantation, en particulier de cellules, tissu, ou organe génétiquement différent(es),
- d'un effet potentiel de type GVL que des cellules, un tissu ou un organe génétiquement différent(es) pourraient exercer sur un homme ou animal.

La méthode selon l'invention permet également le suivi de l'éventuelle

apparition de telles réactions après greffe ou transplantation allo- ou xénogénique.

La méthode selon l'invention peut également être appliquée à la détermination de l'état d'activation de cellules NK et/ou T à un instant donné chez un animal ou un homme. Elle permet alors la prévision ou le suivi de l'état de résistance d'un animal ou d'un homme vis-à-vis d'une infection virale, telle qu'une infection par un VIH, d'une infection parasitaire, telle que la malaria, d'une infection bactérienne, vis-à-vis d'une maladie auto-immune, telle que la polyarthrite rhumatoïde, ou bien encore vis-à-vis du développement de cellules malignes telles que des cellules leucémiques. L'utilisation prévisionnelle de la méthode selon l'invention est d'un intérêt particulier dans le cadre d'épidémies.

La méthode selon l'invention peut également être avantageusement appliquée au criblage de médicaments actifs vis-à-vis de maladies infectieuses, de maladies auto-immunes, ou de maladies tumorales.

La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en oeuvre de ladite méthode comprenant dans un récipient, au moins une dite paire d'oligonucléotides, les réactifs pour la réalisation de ladite ou lesdites méthode(s) tels que tampon, marqueur (éventuellement couplé aux oligonucléotides de la dite paire), ainsi qu'un mode d'emploi.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront encore à travers les exemples de réalisation suivants, donnés à titre indicatif et non limitatifs.

Lesdits exemples font référence aux Figures 1 et 2 :

La Figure 1 représente les produits issus d'une amplification par PCR (amplification en chaîne par polymérase après RT transcription enzymatique inverse à l'aide de paires d'oligonucléotides selon l'invention servant d'amorces), des séquences codantes pour p50.2 (Fig. 1A) et p58.2 (Fig. 1B) dans des cellules NK humaines;

La Figure 2 représente les produits issus d'une amplification par PCR de la

séquence codante pour p50.2 à partir du DNA génomique de souris transgéniques p50.2<sup>+</sup>.

Exemple 1 : Documentation du répertoire NKR/contreparties de NKR exprimé par une population de cellules NK humaines (RT-PCR).

#### 1. Préparation des ARN

Des préparations ARN ont été réalisées à partir de cellules NK humaines clonées et phénotypées p50.2<sup>+</sup> et/ou p58.2<sup>+</sup>. La technique immunologique ne permet pas de documenter précisément un tel répertoire : l'anticorps GL183 (Immunotech) reconnaît à la fois le récepteur NKR inhibiteur p58.2 et sa contrepartie activatrice p50.2. Des cellules NK humaines clonées et phénotypées p50.2<sup>-</sup> et p58.2<sup>-</sup> à l'aide de l'anticorps GL183 servent de témoins négatifs.

Les préparations ARN sont réalisées comme suit.

#### Extraction

100 µl de Trizol (Gibco BRL catégorie n°15596-026) ont été ajoutés à 10<sup>6</sup> cellules. On mélange en pipetant plusieurs fois, sans utiliser de mélangeur à vortex. On laisse la solution 5 minutes à température ambiante puis on ajoute 20 µl de chloroforme sans alcool isoamylique. On mélange à nouveau sans utiliser de mélangeur à vortex et on laisse la solution se reposer 5 minutes à température ambiante. On centrifuge alors à 4°C pendant 15 minutes de manière à bien séparer la phase organique inférieure, qui contient l'ADN, de la phase aqueuse supérieure qui contient l'ARN. On récupère la phase aqueuse sans perturber l'interface entre phase aqueuse et phase organique.

#### Précipitation

50 µl d'isopropanol sont ajoutés à la phase aqueuse et on laisse l'ARN précipiter pendant 15 minutes à température ambiante. On centrifuge alors pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé, et le culot est lavé avec 100 µl d'éthanol à 70%. Après centrifugation pendant 5 minutes à 4°C (7500 g), on laisse sécher à l'air libre (sans sécher sous vide). Le culot d'ARN est remis en



suspension dans 20 ml d'H<sub>2</sub>O.

## 2. Préparation des paires d'oligonucléotides

Le tableau 1 ci-dessous présente les paires d'oligonucléotides utilisées. Sont ici rapportés les résultats relatifs à l'utilisation des paires d'oligonucléotides C (SEQ ID n°4 en tant qu'oligonucléotide 5' et un équimélange de SEQ ID n°5, n°2, n°6 et n°7 en tant qu'oligonucléotide 3') et D (SEQ ID n°8 en tant qu'oligonucléotide 5' et SEQ ID n°3 en tant qu'oligonucléotide 3') présentées dans le tableau 1. Les séquences ADNc, sur la base desquelles ces paires d'oligonucléotides ont été mises au point, sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous (nom des clones ADNc et numéro d'accès sur Genbank). Pour chaque paire d'oligonucléotides, ont ainsi été pris en compte les variants alléliques et les variants d'excision-épissage (épissage alternatif) connus d'un même récepteur.

Chaque paire d'oligonucléotides est construite, après alignement des séquences ADNc connues des différents variants d'un même récepteur cible (*e.g.* le KIR p58.2), de manière à ce que cette paire puisse déterminer, sur l'ensemble de ces variants, les bornes d'un fragment consensus, sans pour autant pouvoir faire de même sur un quelconque variant du récepteur contrepartie du récepteur cible (*e.g.* le KAR p50.2). La séquence de chaque oligonucléotide d'une même paire est ensuite optimisée de manière à ce que la température d'anneilage (annealing en anglais) de chacune d'elles soit proche (*e.g.*  $\Delta T \leq 5^{\circ}\text{C}$ ).

Chaque oligonucléotide présente en effet une température d'anneilage (ou d'hybridation) qui lui est propre. Cette température d'anneilage est fonction du rapport  $R = \frac{G + C}{\text{nombre total de bases}} \times 100$  et de la longueur de l'oligonucléotide  $(A + T + G + C)$

considéré, selon la formule : Température d'anneilage (ou d'hybridation) d'un oligonucléotide =

$$T_m = 69,3 + 0,41(R) - \frac{650}{\text{longueur en pb}} \text{ (en } ^{\circ}\text{C)}$$

Or, dans une réaction de type amplification en chaîne par polymérase les oligonucléotides d'une même paire doivent pouvoir tous deux s'anneler au récepteur cible dans des conditions de réaction communes, ceci afin de servir d'amorces à l'amplification du fragment consensus. Si les oligonucléotides d'une même paire présentent des températures propres d'annelage proches (*e.g.* 54°C et 56°C), ils pourront s'hybrider au récepteur cible, sans pour autant s'hybrider au récepteur contrepartie correspondant, à une température de 54°C ou 55°C.

Si les oligonucléotides d'une même paire présentent par contre des températures propres d'annelage très distantes (*e.g.* 49°C et 56°C), la réaction d'hybridation au récepteur cible est préférentiellement conduite à la plus basse des deux températures (*e.g.* 49°C ou 50°C), ce qui permet de maintenir la reconnaissance de sa cible nucléotidique par l'oligonucléotide dont la température propre d'annelage est la plus basse. Dans cette situation, une diminution de spécificité peut toutefois intervenir : il peut être observé que certaines paires d'oligonucléotides parviennent, dans de telles conditions de température, à s'hybrider au récepteur-contrepartie du récepteur cible. Une manière de remédier à cette perte de spécificité consiste à augmenter la longueur de l'oligonucléotide dont la température propre d'annelage est la plus basse, sans faire perdre à la paire d'oligonucléotides considérée sa spécificité.

### 3. Amplification en chaîne par polymérase après transcription enzymatique inverse (RT-PCR)

5 µg d'ARN totaux sont transcrits en ADNc par incubation avec une transcriptase inverse (RT) à l'aide du kit First Strand DNA-Ready to go (Pharmacia). 10 µl d'ADNc sur les 33 µl obtenus sont mis en contact avec les paires d'oligonucléotides C et D qui servent alors d'amorces (cf. tableau 1): 10 µl de produit issu de RT; Tampon PCR 10X : 10µl; MgCl<sub>2</sub> 50mM; dXTP 10 mM; Oligonucléotides 3' à 10 µM : 5 µl; Oligonucléotide 5' 10 µM : 5 µl; Taq polymérase : 0,5 µl; H<sub>2</sub>O : qsp 100 µl. L'amplification par PCR (DNA engine

PTC 200, MJ Research, Massachussets) est réalisée en suivant les étapes suivantes :

- étape n°1 (dénaturation initiale) : 5 min à 94°C,
- étape n°2 : 35 cycles comprenant
  - a) dénaturation 1 min à 94°C
  - b) anelage 1 min à 55°C pour la paire C et 50°C pour la paire D d'oligonucléotides,
  - c) extension 1 min à 72°C,
- étape n°3 : (extension finale) :  
1 min à 72°C.

La durée de l'extension 2c peut être augmentée si le fragment à amplifier a une grande taille (*e.g.* supérieure à 1000-1400pb environ).

La température de l'étape d'anelage 2b dépend de la paire d'oligonucléotides utilisés comme amorces (*cf.* point 2. ci-avant). Elle correspond à une température consensus entre les températures propres d'anelage de chacun des deux oligonucléotides faisant paire (température moyenne ou température la plus basse des deux). Cette température est généralement comprise entre 45°C et 70°C, préférentiellement entre 50°C et 65°C.

10 µl des produits issus de l'amplification par RT-PCR sont résolus par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en parallèle avec des marqueurs de poids moléculaires (M).

Les résultats sont illustrés sur les figures 1A et 1B.

La figure 1 illustre l'amplification par PCR après RT (transcription enzymatique inverse) des séquences codantes pour p58.2 et p50.2 de cellules NK humaines.

En figure 1A est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par RT-PCR après mise en contact de la paire d'amorces D selon l'invention (*cf.* tableau 1) avec les populations ADNc de

cellules NK humaines phénotypées  $p50.2^+$  et  $p58.2^+$  (piste +) à l'aide de l'anticorps GL183, ou avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées  $p50.2^-$  et  $p58.2^-$  (piste -) à l'aide de ce même anticorps GL183. En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaire.

En figure 1B, est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par RT-PCR après mise en contact de la paire d'amorces C selon l'invention (cf. tableau 1) avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées  $p50.2^+$  et  $p58.2^+$  (piste +) à l'aide de l'anticorps GL183, ou avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées  $p50.2^-$  et  $p58.2^-$  (piste -) à l'aide de ce même anticorps GL183. En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaire.

Il peut être observé que les paires d'oligonucléotides C et D selon l'invention permettent de reconnaître respectivement un phénotype, respectivement,  $p58.2^+$  et  $p50.2^+$ , en reconnaissant un fragment de, respectivement, 653 pb et 533pb. La méthode selon l'invention permet donc de discriminer entre un phénotype  $p58.2^+$  (récepteur KIR, à fonction inhibitrice) et un phénotype  $p50.2^+$  (récepteur KAR contrepartie de  $p58.2$ , à fonction activatrice), ce qui n'était jusqu'à présent pas réalisable sous séquençage.

Exemple 2 : Documentation du répertoire génétique (potentiel) NKR/contreparties de NKR d'une population de splénocytes de souris transgéniques  $p50.2^+$  (PCR).

### 1 - Préparation des ADN

Des préparations ADN ont été réalisées à partir de splénocytes de souris transgéniques  $p50.2^+$ . La technique immunologique ne permet pas de déterminer si de tels splénocytes sont  $p50.2^+$  (récepteur KAR, activateur) ou  $p58.2^+$  (récepteur KIR, inhibiteur, ou bien encore  $p50.2^+$  et  $p58.2^+$ ). Des splénocytes de souris non transgéniques ( $p50.2^-$ ) servent de témoins négatifs.

### Extraction

Cette étape est réalisée comme décrit en exemple 1. Les ADN étant contenus dans la phase organique inférieure, c'est ici cette phase qui est récupérée après avoir éliminé la phase aqueuse et un peu d'interface.

### Précipitation

On ajoute 30 µl d'éthanol à 100% et on laisse reposer 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation pendant 5 minutes à 4°C (2 000g), on jette le surnageant et on lave le culot avec 100 µl de citrate de sodium 0,1M dans de l'éthanol à 10%. On laisse 30 minutes à température ambiante en mélangeant de temps en temps. On centrifuge pendant 5 minutes à 4°C (2 000g). On répète ce lavage une seconde fois.

Le culot d'ADN obtenu est remis en suspension dans 200 µl d'éthanol à 70%. On laisse 15 minutes à température ambiante en mélangeant de temps en temps et on centrifuge pendant 5 minutes à 4°C (2 000g).

Le culot est mis à sécher brièvement sous vide (1 à 2 µg d'ADN environ sont obtenus) et est remis en suspension dans 10 µl de NaOH 8mM. En cas de présence de matériel insoluble, on microcentrifuge 10 minutes à température ambiante. On transfère le surnageant dans un nouveau tube. Le pH est neutralisé en ajoutant 1,25 µl d'Hepes 0,1 M pour 10 µl.

### 2 - Préparation des paires d'oligonucléotides

Les paires d'oligonucléotides sont préparées comme décrit en exemple 1. Sont ici rapportés les résultats relatifs à la paire D d'oligonucléotides (SEQ ID n°8 en tant qu'oligonucléotide 5' et SEQ ID n°3 en tant qu'oligonucléotide 3') selon l'invention (cf. tableau 1 ci-dessous).

### 3 - Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

L'amplification en chaîne par polymérase est réalisée comme décrit en exemple 1 en mettant en contact les préparations d'ADN génomiques obtenues avec des paires d'oligonucléotides D servant alors d'amorces.

Les produits issus de l'amplification sont résolus sur gel d'agarose à 2% en parallèle avec des marqueurs de poids moléculaires (M).

Les résultats de résolution électrophorétique sur gel d'agarose à 2% des produits issus de la PCR sont illustrés par la figure 2.

La figure 2 illustre l'amplification par PCR de la séquence codante pour p50.2 à partir du DNA génomique de splénocytes de souris transgéniques p50.2<sup>+</sup> : y est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par PCR après mise en contact de la paire d'amorces D selon l'invention (*cf.* tableau 1) avec les populations ADN de splénocytes de souris transgéniques p50.2<sup>+</sup> (pistes +) ou de souris non transgéniques p50.2<sup>-</sup> (pistes -). En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaires.

Les amorces D selon l'invention permettent de reconnaître un fragment de 533 pb présent sur l'ADN de splénocytes murins p50.2<sup>+</sup> et absent sur l'ADN de splénocytes murins p50.2<sup>-</sup>.

Des résultats comparables ont été obtenus avec les paires d'oligonucléotides A, B et E à L présentées dans le tableau 1 ci-après et ont également permis de documenter les récepteurs visés (*cf.* colonne "molécule" du tableau 1).

Les répertoires NKR et/ou contreparties de NKR ainsi documentés peuvent être, notamment à l'aide d'études biostatistiques classiques, corrélés à des situations physiologiques ou pathologiques données, liées à ces répertoires, et au contrôle de l'activation des cellules les exprimant en général.

Tableau 1

| Paire d'oligo | Molécule        | Fonction   | T <sub>m</sub> | Nom de l'oligo                      | Séquence de l'oligo (5'-->3')                        | Séquence                               | Oligo 5' |
|---------------|-----------------|------------|----------------|-------------------------------------|--|--|----------|
| A             | p58.EB6 (p58.1) | Inhibiteur | 56°C<br>54°C   | p58.1 FOR<br>ITIM N-term BACK       | AGTCGCATGACGCAAGAC<br>CAACTGTG(T/C) (A/G) TATGTCAC   | Seq ID N°1<br>Seq ID N°5, 2, 6, 7      | Oligo 3' |
| B             | p50.EB6 (p50.1) | Activateur | 56°C<br>49°C   | p58.1 FOR<br>TM-ACT BACK            | AGTCGCATGACGCAAGAC<br>GATGGTGAAAGGGATTTT             | Seq ID N°1<br>Seq ID N°3               |          |
| C             | p58.183 (p58.2) | Inhibiteur | 56°C<br>54°C   | p58.2 FOR<br>ITIM N-term BACK       | GGTCCCATGATGCAAGAC<br>CAACTGTG(T/C) (A/G) TATGTCAC   | Seq ID N°4<br>Seq ID N°5, 2, 6, 7.     |          |
| D             | p50.183 (p50.2) | Activateur | 56°C<br>49°C   | p58.2 FOR<br>TM-ACT BACK            | GGTCCCATGATGCAAGAC<br>GATGGTGAAAGGGATTTT             | Seq ID N°8<br>Seq ID N°3               |          |
| E             | p70.INH         | Inhibiteur | 58°C<br>54°C   | p70. FOR<br>ITIM N-term BACK        | CCCGTGGTGATCATGGTC<br>CAACTGTG(T/C) (A/G) TATGTCAC   | Seq ID N°9<br>Seq ID N°5, 2, 6, 7.     |          |
| F             | p70.ACT         | Activateur | 58°C<br>49°C   | p70. FOR<br>TM-ACT BACK             | CCCGTGGTGATCATGGTC<br>GATGGTGAAAGGGATTTT             | Seq ID N°9<br>Seq ID N°3               |          |
| G             | p140.INH        | Inhibiteur | 56°C<br>58°C   | ITIM N-term. FOR<br>Ext C-term BACK | GTGAC (A/G) TAC (A/G) CACAGTTG<br>ACCTGACTGTGGTGCTCG | Seq ID N°10, 11, 12, 13<br>Seq ID N°14 |          |

Tableau 1 (suite)

| II | p140. ACT | Activateur | 58°C<br>49°C | p140. FOR<br>TM-ACT BACK       | ACCTACAGATGTTATGGTTCGTGTT<br>GATGGTGAAAGGATTTT     | Seq ID N°15<br>Seq ID N°13 |
|----|-----------|------------|--------------|--------------------------------|--|----------------------------|
| I  | NKG2A     | Inhibiteur | 54°C<br>54°C | NKG2A FOR<br>NKG2A/ B/C. BACK  | TCTACATTAAATACAGAGGCAC<br>ATCTATAGAAAGCAGACT       | Seq ID N°16<br>Seq ID N°17 |
| J  | NKG2 B    | Inhibiteur | 52°C<br>54°C | NKG2 B FOR<br>NKG2A/ B/C. BACK | ATTCCCTCACGTCATTGT<br>ATCTATAGAAAGCAGACT           | Seq ID N°18<br>Seq ID N°17 |
| K  | NKG2C     | Activateur | 54°C<br>54°C | NKG2C. FOR<br>NKG2A/ B/C. BACK | AGTAAACAAAGAGGAAACCTTC<br>ATCTATAGAAAGCAGACT       | Seq ID N°19<br>Seq ID N°17 |
| L  | NKG2D     | Activateur | 56°C<br>58°C | NKG2D. FOR<br>NKG2D. BACK      | AGCAAAGAGGACCAGGATTTA<br>CACAGTCCTTTGCATGCAGAT     | Seq ID N°20<br>Seq ID N°21 |
| M  | CD56      |            | 51°C<br>54°C | 5' hCD56<br>3' hCD56           | ATCCAGTACACTGATGAC<br>CTCGATGGATGGTGAAGA           | Seq ID N°22<br>Seq ID N°23 |
| N  | Actine    |            | 62°C<br>64°C | 5' Actine<br>3' Actine         | TACCACCTGGCATCGTATGGACT<br>TCCTTCTGCATCCTGTCGGCAAT | Seq ID N°24<br>Seq ID N°25 |



TABLEAU 2

| Paire<br>d'oligonucléotides | nom du CDNA  | Numéro<br>d'accès<br>sur<br>Genbank  |
|-----------------------------|--|--|
| A                           | c1-42<br>NKAT-1<br>c1-47.11  | U24076<br>L41267<br>U24078   |
| B                           | X98858<br>X98892<br>NKAT-7AA<br>NKAT-9AA   | X98585<br>X98892<br>L76670<br>L76672   |
| C                           | c1-43<br>NKAT-6AA<br>NKAT-2 EA<br>c1-6<br>NKAT-2<br>KIR-023G B<br>NKAT-2A B<br>NKAT-3DA      | U24075<br>L76669<br>L76663<br>U24074<br>L41268<br>U73395<br>L76662<br>L76664           |
| D                           | c1-49<br>NKAT-5<br>X89893<br>c1-39<br>NKAT-8<br>NKAT-5DA                                     | U24079<br>L41347<br>X89893<br>U24077<br>L76671<br>L76667                               |
| E                           | X94262<br>NKAT-3<br>NK HI-1<br>NK HI-2<br>KIR-103AS<br>KIR-103AST<br>c1-1.1<br>c1-11<br>c1-2 | X94262<br>L41269<br>U31416<br>U33328<br>U71199<br>U73394<br>X94373<br>U30274<br>U30273 |
| F                           | NKAT-10<br>KIR-123FM   | L76661<br>U73396   |
| G                           | NKAT-4<br>X94374<br>X93595<br>X93596<br>NKAT-4 EA<br>NKAT-4AA<br>c1-5                        | L41270<br>X94374<br>X93595<br>X93596<br>L76666<br>L76665<br>U30272                     |

Tableau 2 (suite)

|   |        |          |
|---|--------|----------|
| I | NKG2A  | X5 48 67 |
| J | NKG2 B | X5 48 68 |
| K | NKG2 C | X5 48 69 |
| L | NKG2D  | X5 48 70 |

## REVENDICATIONS

1. Méthode *in vitro* de documentation d'un répertoire en  
5 immunorécepteur(s) NKR comprenant notamment les récepteurs KIR p58.1,  
p58.2, p70.INH, p140.INH, et les récepteurs NKG2A et NKG2B, et/ou d'un  
répertoire en immunorécepteur(s) contrepartie(s) de NKR, comprenant  
notamment les récepteurs KAR p50.1, p50.2, p70.ACT, p140.ACT, et les  
récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F, ces immunorécepteurs étant  
10 ci-après désigné(s) récepteur(s) cible(s), caractérisée en ce qu'elle comprend :
- i. l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides, l'un étant désigné  
oligonucléotide 3' et l'autre oligonucléotide 5', les oligonucléotides 3' et 5'  
d'une même dite paire étant tous deux capables, dans des conditions  
d'hybridation correspondant à une incubation pendant 1 min dans un tampon  
15 [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM] à une température  
comprise entre 50°C et 65°C environ, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc  
d'un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, mais ne s'hybridant pas,  
dans les mêmes conditions d'hybridation, avec l'ADN ou l'ADNc d'un  
récepteur contrepartie de NKR, ou respectivement d'un récepteur NKR,  
20 contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible,
  - ii. la mise en contact de populations ADN ou ADNc d'un échantillon  
biologique d'origine humaine ou animale pour lequel on souhaite documenter  
le répertoire en immunorécepteur(s) cible(s), avec un excès d'au moins une  
paire d'oligonucléotides 3' et 5' selon i. dans des conditions favorables à  
25 l'hybridation de cette paire oligonucléotides 3' et 5' sur les ADN ou sur les  
ADNc de l'échantillon biologique, et
  - iii. la détection des hybrides éventuellement formés entre ces ADN ou ADNc  
et la ou les paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5'.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite ou au moins une desdites paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée(s) est en outre capable, dans les mêmes conditions d'hybridation que celles définies sous i., de ne pas s'hybrider à l'ADN ou ADNc d'un récepteur, indifféremment NKR  
5 ou contrepartie de NKR, autre que ledit récepteur cible.
3. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'oligonucléotide 5' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) est capable dans les mêmes dites conditions d'hybridation de s'hybrider à l'ADN  
10 ou à l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR).
4. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'oligonucléotide 3' d'une dite paire d'oligonucléotides  
15 3'et 5', utilisée pour un récepteur cible KAR, est capable, dans les mêmes dites conditions d'hybridation, de s'hybrider à l'ADN ou ADNc dudit récepteur cible KAR au niveau d'un enchaînement nucléotidique qui comprend une séquence correspondant, selon le code génétique universel, et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, à la séquence d'acides  
20 aminés Lys Ile Pro Phe Thr Ile (K I P F T I) ou Lys Leu Pro Phe Thr Ile (K L P F T I) (SEQ ID n°26 ou 27).
5. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KIR est  
25 choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :  
un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
- au moins un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°10, n°11, n°12, ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.
6. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KAR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
  - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
  - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
  - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.
7. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2 est

choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :  
un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°16, ou une séquence  
en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17,  
ou une séquence en dérivant,

- 5 un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°18, ou une séquence  
en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17,  
ou une séquence en dérivant,

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°19, ou une séquence  
en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17,

- 10 ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°20, ou une  
séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ  
ID n°21, ou une séquence en dérivant.

08. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
15 caractérisée en ce que les deux oligonucléotides 3' ou 5' d'une même dite  
paire sont chacun couplés à un marqueur, notamment couplée à un marqueur  
fluorescent ou radioactif, tel que du  $^{32}\text{P}$ , permettant la révélation des hybrides  
qu'ils forment éventuellement avec lesdites populations ADN ou ADNc dudit  
échantillon biologique.

- 20 9. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
caractérisée en ce que ladite (ou lesdites) paire(s) d'oligonucléotide(s) 3' et 5'  
sert (servent) d'amorces respectivement 3' et 5' pour une extension par ADN  
polymérase.

10. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
25 caractérisée en ce que lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés  
par au moins une PCR préalablement à leur détection.

11. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
caractérisée en ce que lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés

par "Nested PCR" (double PCR emboîtée).

12. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite détection des hybrides éventuellement formés comprend en outre la résolution sur gel de polyacrylamide du mélange  
5 réactionnel issu de la mise en contact, ainsi que la révélation de la présence ou de l'absence de bandes électrophorétiques contenant lesdits hybrides éventuellement formés.

13. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la documentation d'un répertoire  
10 génotypique en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR.

14. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la documentation d'un répertoire d'expression en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs  
15 contreparties de NKR.

15. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit échantillon biologique d'origine humaine ou animale est du sang périphérique, de la moelle osseuse, des lymphocytes, des cellules NK et/ou T, des cellules transgéniques exprimant des  
20 immunorécepteurs, une fraction isolée à partir de ces échantillons.

16. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée au criblage d'une banque d'organes, de tissus ou de cellules.

17. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de  
25 l'acceptation ou du rejet, par un homme ou un animal, de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

18. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,

caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de l'inocuité ou de la pathogénicité (GVH) d'une greffe ou transplantation, par un homme ou un animal, de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

5 19. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi, pour un homme ou un animal, d'un effet de type GVL de la part de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

20. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
10 caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détermination de l'état d'activation de cellules NK et/ou T à un instant donné chez un animal ou un homme.

21. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de l'état de  
15 résistance d'un animal ou d'un homme vis-à-vis d'une infection virale, telle qu'une infection par un VIH, d'une infection parasitaire, telle que la malaria, d'une infection bactérienne, vis-à-vis d'une maladie auto-immune, telle que la polyarthrite rhumatoïde, ou bien encore vis-à-vis du développement de cellules malignes telles que des cellules leucémiques.

20 22. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée au criblage de médicaments actifs vis-à-vis de maladies infectieuses, de maladies auto-immunes, ou de maladies tumorales.

23. Kit pour la mise en oeuvre de la méthode selon l'une quelconque des  
25 revendications 1 à 22, caractérisé en ce qu'il comprend, dans un récipient, au moins une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5', les réactifs pour la réalisation de ladite ou lesdites méthode(s) tels que tampon, marqueur (éventuellement couplé aux oligonucléotides de la dite paire), ainsi qu'un mode d'emploi.



1/2

FIGURE 1B

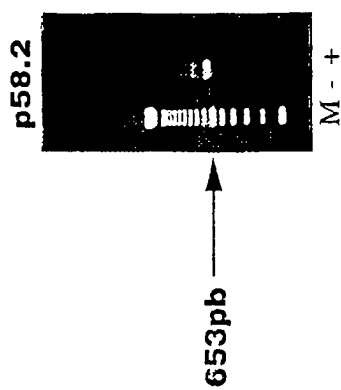


FIGURE 1A

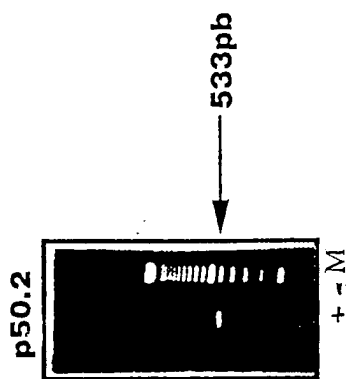
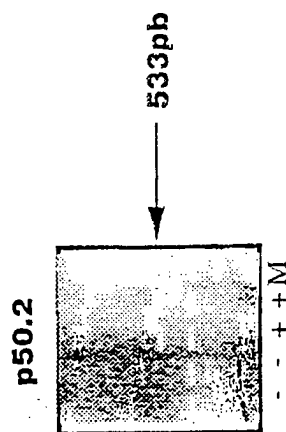


FIGURE 1

2/2

FIGURE 2



## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: I. N. S. E. R. M.
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Méthode de documentation en immunorécepteurs NKR et en immunorécepteurs contreparties de NKR

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 27

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OE B)

## 2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 13 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

## (vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: p58.1 FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGTCGCATGA CGCAAGAC

18

## 3. INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

## (vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CAACTGTGTG TATGTCAC

18

## (4) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: TM-ACT BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GATGGTGAAA GGGATTTT

13

(5) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p53.2.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGTCCCATGA TGCAAGAC

18

(6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CAACTGTGTA TATGTCAC

18

(7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CAACTGTGCA TATGTCAC

18

## (8) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAACTGTGCG TATGTCAC

18

## (9) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p58.2 FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGTCCCATGA TGCAAGAC

18

## (10) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p70.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCCGTGGTGA TCATGGTC

18

## (11) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:  
GTGACATACA CACAGTTG 18
- (12) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:  
GTGACATACG CACAGTTG 18
- (13) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:  
GTGACGTACA CACAGTTG 18
- (14) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:  
GTGACGTACG CACAGTTG 18
- (15) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: Ext C-term BACK  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:  
ACCTGACTGT GGTGCTCG

18

(16) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 24 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: p140.FOR  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:  
ACCTACAGAT GTTATGGTTC TGTT

24

(17) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 21 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2A.FOR  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:  
TCTACATTAA TACAGAGGCA C

21

(18) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2A/ E/C. BACK  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:  
ATCTATAGAA AGCAGACT

18

(19) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2 B FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

ATTCCTCAG GTCATTGT

18

(20) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2C FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AGTAAACAAA GAGGAACCTT C

21

(21) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2D FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

AGCAAAGAGG ACCAGGATTT A

21

(22) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2D BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

CACAGTCCTT TGCATGCAGA T

21

(23) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:



- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: 5' hCD56
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:  
ATCCAGTACA CTGATGAC 18
- (24) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 18 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: 3' hCD56
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:  
GTCGATGGAT GGTGAAGA 18
- (25) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 23 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: 5' Actine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:  
TACCACTGGC ATCGTGATGG ACT 23
- (26) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR 23 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique  
(vi) ORIGINE:  
(C) INDIVIDU/ISOLE: 3' Actine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:  
TCCTTCTGCA TCCTGTGGC AAT 23
- (27) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 6 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26

Lys Ile Pro Phe Thr Ile

1

5

## (28) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR 5 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27

Lys Leu Pro Phe Thr Ile

1

5